

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA  
BROMELINA EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS  
PEG/FOSFATO**

Autora: Juliana Ferrari Ferreira

Orientador : Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Dissertação de Mestrado apresentada  
à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos requisitos exigidos  
para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química.

CAMPINAS – SÃO PAULO  
SETEMBRO / 2007

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA: F413c  
T/UNICAMP  
V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_  
TOMBO BCCL 76991  
PROC 168-129-08  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 04-06-08  
BIB-ID 436628

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

F413c

Ferreira, Juliana Ferrari

Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. / Juliana Ferrari Ferreira.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bromelina. 2. Abacaxi. 3. Benzimas – Purificação. 4. Extração química. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Bromelain enzyme characterization and purification using two aqueous phases system PEG/Phosphate

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Pineapple, Purification, Liquid-liquid extraction, Two aqueous phase system

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Maria Elizabeth Brotto, José Carlos Curvelo Santana

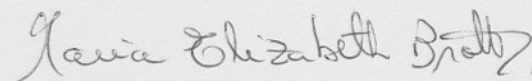
Data da defesa: 24/09/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado , defendida por Juliana Ferrari Ferreira , em 24 de setembro de 2007  
, e aprovada pelos seguintes doutores



Elias Basile Tambourgi – orientador



Maria Elizabeth Brotto



Jose Carlos Curvelo Santana

200810774

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado defendida por Juliana Ferrari  
Ferreira , em 24 de setembro de 2007



Elias Basile Tambourgi – orientador

Deixo aqui meus agradecimentos aos meus pais, Deusdile Antonio  
Ferreira e Maria Lucia Ferreira  
Ferreira, com todo amor e carinho.

*Dedico:  
Aos meus pais, Deusdele Antonio  
Ferreira e Maria Lucia Ferrari  
Ferreira, com todo amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao professor Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade, paciência, dedicação, confiança, incentivo e pelas oportunidades que me proporcionou durante todo o desenvolvimento deste trabalho, de extrema importância e de grande contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

A toda minha família, em especial meus pais, Deusdele Antonio Ferreira e Maria Lúcia Ferrari Ferreira, meu irmão Rogério e meus avós, Geni e Osvaldo Ferrari, por servirem de espelho para a minha educação e caráter e por todo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo que foram a mim dispensados durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À José Vicente, pelo exemplo de pesquisador competente, por todo carinho, paciência, companheirismo e incentivo dedicados a mim durante este trabalho.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Processos de Separação, Edgar, Daniela, Giovana, Mariele e Thayse, em especial ao meu grande amigo José Carlos Curvelo Santana, por toda a ajuda, paciência, incentivo, amizade e dedicação a mim dispensados durante este trabalho.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Engenharia Química e Sistemas Químicos (DESQ) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A todos os amigos, que de uma forma ou outra colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a Todos, serei sempre muito grata a vocês!

## RESUMO

A bromelina é uma protease de origem vegetal, obtida de diversas espécies da família *Bromeliaceae*, que está presente no talo e no fruto do abacaxi. O uso da bromelina é baseado em sua atividade proteolítica nas indústrias alimentícias e principalmente na farmacêutica brasileira. A bromelina é muito bem documentada pelos seus efeitos curativos em todas as condições inflamatórias, além de ter sua eficácia provada na cura de vários outros problemas de saúde, tais como: angina, indigestão e problemas respiratórios.

Vários métodos de purificação da bromelina estão em estudo, sobretudo da bromelina do talo. A extração líquido-líquido é aplicada há muitos anos como uma valiosa técnica laboratorial de separação. Esta pode ser usada como um passo da pré-purificação usando um sistema de duas fases aquosas. Esses sistemas foram testados com sucesso, são sistemas formados por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, obtidas pela mistura de polímeros hidrofílicos ou um desses polímeros e um sal, como o sistema PEG (polietileno glicol) e o fosfato de potássio.

O presente trabalho estudou a caracterização da enzima e a recuperação da bromelina presente na casca e talo do abacaxi, por extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas PEG/ fosfato. Realizou-se ensaios em batelada para a extração e recuperação da enzima, utilizando como indicador o coeficiente de partição.

Obtiveram-se diagramas de fases para o sistema fosfato de potássio e polietileno glicol 1500 e 4000 nos pH's de 6 a 11, a 25 °C. Estudou-se três diferentes "tie-lines". Analisou-se a influência do pH e do comprimento das "tie-lines" no coeficiente de partição da enzima.

## ABSTRACT

The bromelains are proteases from vegetable origin, obtained from several species of Bromeliaceae family, which are found in pineapple's stem and fruit. The bromelains uses are based on its proteolytic activity on food industries and mostly at Brazilian pharmaceutical industry. The bromelains has been documented by its therapeutic effects at all inflammatory conditions, in addition to its attested efficiency of cure of various health problems, such as angina, indigestion and respiratory problems.

Various bromelains' purification methods has been studied, particularly of stem's bromelain. Aqueous two-phase systems has been applied for several years as a good laboratorial separation technique and they can be used as a pre-purification step. These systems have been tested with large success. The systems are formed by two aqueous phases immiscible or partially miscible within themselves, obtained by the addition of hydrophilic polymers or one hydrophilic polymer and a salt, such as the poly(ethylene glycol) – PEG – and potassium phosphate salt systems.

This work studied the enzyme characterization and recuperation presented in the pineapple's stem and skin, by aqueous two-phase systems liquid-liquid extraction. Batch assays were performed aiming the enzyme extraction and recuperation, using the partition coefficient as indicator.

The phase diagrams from PEG and potassium phosphate salts aqueous two-phase systems were obtained for PEG molecular weight of 1500 and 4000 at pH 6.0 to 11.0, at 25 °C. Three different tie-lines were also studied. The pH and tie-line length influence on the enzyme partition coefficient were analysed.



## Sumário

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Introdução .....	1
1.2 – Objetivos .....	4
Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Enzimas .....	5
2.2. Abacaxi: Produção, Mercado e Subprodutos .....	6
2.3. Posição no mercado mundial e principais estados produtores .....	7
2.4. Composição química do abacaxi .....	7
2.5. Bromelina .....	9
2.6. Desnaturação .....	11
2.7. Proteína total, Atividade e Açúcares Redutores .....	12
2.8. Consumo de Bromelina .....	13
2.9. Separação e Purificação de Proteínas .....	15
2.10. Extração Líquido-Líquido .....	16
2.11. Extração em duas Fases Aquosas .....	17
2.11.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas .....	17
2.11.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas .....	20
2.11.3. Polietileno Glicol .....	21
2.11.4. Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico .....	22
2.11.5. Recuperação de Sais e Polímeros .....	23
2.11.6. Sistema PEG/Sal .....	24
2.12. Diagrama de Fases .....	25
2.13. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases .....	26

2.14. Fundamentos de Partição das Proteínas .....	28
2.14.1. Coeficiente de Partição .....	29
2.14.2. Influência da Massa Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição .....	30
2.14.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição.....	31
2.14.4. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição .....	31
2.14.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição .....	32
2.14.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição	33
2.15. Tempo de Separação das Fases .....	33
2.16. Equação do Coeficiente de Partição .....	34
2.17. Aplicações do SBA em Larga escala .....	35
2.18. Aspectos econômicos .....	37
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
3.1. Materiais.....	39
3.1.1. Reagentes.....	39
3.1.2. Equipamentos .....	40
3.2. Métodos .....	41
3.2.1. Preparo das amostras.....	41
3.2.1.1. Preparação da amostra a partir do fruto do abacaxi.....	41
3.2.1.2. Preparo do reativo de biureto.....	41
3.2.1.3. Preparo da solução padrão de proteína.....	42
3.2.1.4. Preparo do Reagente de Bradford.....	42
3.2.1.5. Preparo das soluções de PEG .....	42
3.2.1.6. Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico.....	42

3.2.1.7. Preparo da solução de KOH 1 M .....	43
3.2.1.8. Preparo dos Tampões.....	43
3.2.2. Determinação da temperatura ótima .....	43
3.2.3. Determinação do pH ótimo.....	44
3.2.4. Procedimento para a obtenção das binodais .....	46
3.2.5. Obtenção das “tie-lines” .....	46
3.2.6. Metodologia de obtenção do coeficiente de partição da enzima bromelina. ....	47
3.2.7. Calibração do espectrofotômetro .....	48
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	51
4.1. Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por bromelina da casca e talo do abacaxi .....	53
4.2. Determinação do diagrama de fases .....	54
4.2.1. Efeito do pH sobre o diagrama de fases .....	55
4.3. Estudo do comportamento das “tie-lines” .....	61
4.4. Estudos de partição da bromelina .....	65
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	72
5.1 – CONCLUSÕES.....	72
5.2 – SUGESTÕES .....	74
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Exemplo de um Diagrama de Fases.....	26
Figura 4.1 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica das bromelinas da casca e do talo do abacaxi.....	51
Figura 4.2 – Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica das bromelinas da casca e do talo do abacaxi.....	52
Figura 4.3 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas do talo e casca do abacaxi.....	53
Figura 4.4 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk.....	54
Figura 4.5 - Curva de equilíbrio SBA PEG1500/Fosfato.....	56
Figura 4.6 - Curva de equilíbrio SBA PEG4000/Fosfato.....	56
Figura 4.7 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 6,0.....	58
Figura 4.8 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 7,0.....	58
Figura 4.9 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 8,0.....	59
Figura 4.10 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 9,0.....	59
Figura 4.11 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 10,0.....	60
Figura 4.12 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 11,0.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição química média do abacaxi.....	8
Tabela 2.2 – Dados da concentração das amostras de polpa do fruto, casca e talo do abacaxi.....	13
Tabela 2.3 – Dados de proteína total, atividade e açúcares redutores.....	13
Tabela 4.1 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 6,0.....	61
Tabela 4.2 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 7,0.....	61
Tabela 4.3 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 8,0.....	62
Tabela 4.4 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 9,0.....	62
Tabela 4.5 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 10,0.....	62
Tabela 4.6 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a (25 ± 2) °C, pH 11,0.....	63
Tabela 4.7 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 6,0.....	63
Tabela 4.8 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 7,0.....	63
Tabela 4.9 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 8,0.....	64

Tabela 4.10 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 9,0.....	64
Tabela 4.11 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 10,0.....	64
Tabela 4.12 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a (25 ± 2) °C, pH 11,0.....	65
Tabela 4.13 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 6,0.....	66
Tabela 4.14 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 7,0.....	67
Tabela 4.15 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 8,0.....	67
Tabela 4.16 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 9,0.....	68
Tabela 4.17 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 10,0.....	68
Tabela 4.18 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 11,0.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Atividade enzimática ou específica (U/mg).

BSA - Albumina de Soro Bovina.

SBA – Sistema Bifásico aquoso.

$C_T$  - Concentração de proteína na fase superior no equilíbrio (g/L).

$C_B$  - Concentração de proteína na fase inferior no equilíbrio (g/L).

$FL$  – Fase Leve.

$FP$  – Fase pesada.

FP – Fator de purificação.

$K$  – Coeficiente de Partição.

$K_{\text{eletro}}$  – Coeficiente de partição sob influência do fator eletroquímico.

$K_{\text{hifob}}$  - Coeficiente de partição sob influência do fator de afinidade hidrofóbica.

$K_{\text{bioesp}}$  - Coeficiente de partição sob influência do fator de afinidade bioespecífica.

$K_{\text{tam}}$  - Coeficiente de partição sob influência do tamanho.

$K_{\text{conf}}$  - Coeficiente de partição sob influência do fator de conformação.

$K^0$  - Fatores que podem causar influência em  $K$ .

$K_m$  - Constante de Michaelis–Menten (g/L).

MM – Massa Molar (g/mol).

PEG – Polietileno glicol.

PI - Ponto isoelétrico.

[S] - Concentração do substrato (g BSA/L).

t – Tempo (min).

T – Temperatura ( $^{\circ}$  C).

$V_0$  – Velocidade inicial de reação (micromol de BSA/L.min).

V – Volume (L).

$V_{max}$  - Velocidade máxima da reação (micromol de BSA/L.min).



## Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 - Introdução

Enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador (Said e Pietro, 2002). Possuem atividade catalítica específica, e ainda, apresentam elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (Halpern, 1997). Por serem economicamente viáveis, o emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos (Forgaty e Kelly, 1979; Wiseman, 1987).

Dentre as enzimas de interesse industrial, podemos citar a Bromelina. A bromelina é uma protease de origem vegetal obtida de diversas espécies da família *Bromeliaceae*, que está presente no talo e no fruto do abacaxi. O uso da bromelina é baseado em sua atividade proteolítica nas indústrias alimentícias e principalmente na farmacêutica brasileira.

O uso da bromelina tem sido muito bem documentada pelos seus efeitos curativos em todas as condições inflamatórias, além de ter sua eficácia provada na cura de vários outros problemas de saúde, tais como: angina, indigestão e problemas respiratórios. Introduzida como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador de digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular (Hale et al. 2005).

As enzimas proteolíticas encontradas no talo recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5 (Murachi, 1976). Uma boa fonte da matéria prima a ser utilizada no

processo de recuperação e purificação de enzimas do abacaxi são as cascas e resíduos industriais do processamento do fruto, visto que, uma das maiores dificuldades da indústria de processamento do fruto é a venda do suco da casca, devido ao seu alto custo ocasionado pelo tratamento.

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada com os agentes desnaturantes, isso pelo fato da sua função catalítica depender da conformação na qual a enzima se apresenta (Riegel, 2003). A temperatura, por exemplo, é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (Halpern, 1997). O pH é outro parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de  $H^+$  (Ricardo e Teixeira, 1993).

Uma situação comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos do processo de separação e pelas condições disponíveis para implantação do processo escolhido.

A extração líquido-líquido, que é um dos principais métodos adotados industrialmente, é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (Rabelo, 1999). A extração em duas fases aquosas é uma técnica que vem sendo aplicada

na indústria, principalmente em separação de enzimas, por se tratar de um processo de baixo custo, alta seletividade e com possibilidade de reciclagem dos reagentes. Além disso, as enzimas permanecem estáveis no sistema, devido à alta concentração de água e à utilização de reagentes não desnaturantes.

Entre os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa, destaca-se o sistema PEG-dextran, que apresenta, no entanto, o grande inconveniente do elevado custo do dextran. Esse polímero pode ser obtido por um processo fermentativo ou, diretamente, por síntese enzimática e por síntese química (Harris & Yalpani, 1985). Porém, quase todas as preparações comerciais são obtidas por via fermentativa, e esta, por sua vez, representa um elevado custo. Para combater a falta de competitividade econômica dos sistemas bifásicos constituídos por dextran e PEG, tem-se recorrido, quase exclusivamente, a sistemas PEG-sais.

Sistemas de duas fases aquosas formam-se pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A fase mais leve é rica em polietileno glicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases (Albertsson, 1986).

Eles constituem um meio conveniente e adequado para extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70 e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (Albertsson, 1986).

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e consequentemente alteram o diagrama de fases são: massa molar do polímero, concentração dos componentes do sistema, pH, força iônica e temperatura.

Neste trabalho, foi utilizado como matéria prima o suco do talo e casca do abacaxi para extração e purificação da bromelina.

## 1.2 – Objetivos

Geral:

- Caracterizar e purificar as enzimas bromelinas do talo e casca do abacaxi por sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato.

Específicos:

- Caracterizar a enzima Bromelina, por meio da determinação do pH e temperatura ótimos de sua utilização, bem como seus parâmetros cinéticos;
- Testar diferentes condições para extração da bromelina; alterando as seguintes variáveis: condições de pH; massa molar do polímero e concentração entre as fases;
- Construir os diagramas de equilíbrio de fases do sistema (curvas binodais e *tie-lines*);
- Determinar o coeficiente de partição por meio de ensaios em batelada em sistemas de duas fases aquosas.

## Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enzimas

Enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Elas aumentam a velocidade com a qual as reações atingem o equilíbrio. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador. Um verdadeiro catalisador aumenta a velocidade de reação, mas ele próprio não é modificado durante o processo. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (Said e Pietro, 2002).

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação (Lehninger et al., 1995).

O estudo das enzimas também tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer nos tecidos, a deficiência, ou mesmo a ausência total, de uma ou mais enzimas. As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas, não apenas na Medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura. As enzimas tomam parte até mesmo nas atividades do dia-a-dia do lar, como na preparação de alimentos e na limpeza doméstica (Lehninger et al., 1995).

## 2.2. Abacaxi: Produção, Mercado e Subprodutos

A planta consiste em motivo ornamental para a pintura, arquitetura e escultura, sendo usada sobre pilares de alvenaria na entrada de casas, vilas e jardins. O caule é matéria-prima para a indústria de alimentos e para a obtenção de álcool etílico e gomas. O restante do abacaxizeiro pode ser usado na alimentação animal, como material fresco ou ensilado. Já o seu fruto é consumido ao natural, ou na forma de sorvetes, doces, picolés, refrescos e sucos caseiros. Quando industrializado, o fruto pode apresentar-se como polpa, xarope, geléia, doces em calda ou suco engarrafado. Em regiões secas e quentes obtém-se vinho do fruto doce e fermentado, sendo o suco do fruto verde utilizado como vermífugo em alguns países (Medina et al., 1987).

O abacaxizeiro constitui uma das fruteiras tropicais mais cultivadas no país e também uma das culturas mais exigentes. O processo de florescimento não é uniforme, comprometendo a regularidade da produção e podendo resultar em frutos não enquadrados no padrão comercial. Outro problema consiste na presença de fungos causadores da fusariose que afeta marcadamente o desenvolvimento da cultura do abacaxi no Estado de São Paulo, líder na produção de suco concentrado de abacaxi para exportação (Vaillant et al., 2001).

Além de estudos para solucionar os problemas provocados pela fusariose tem sido realizadas pesquisas para obtenção de frutos com maior teor de sólidos solúveis, menor acidez e coloração mais atraente (Medina et al., 1987). O abacaxi ou ananás, nomes utilizados tanto para a fruta como para a planta, pertence à família *Bromeliaceae* e gênero *Ananas Mill.* Esse gênero é vastamente distribuído nas regiões tropicais por intermédio da espécie *Ananas comosus (L.) Merr.*, a qual abrange todas as cultivares plantadas de abacaxi.

O fruto é normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração. A polpa apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, sendo o peso médio dos frutos de um quilo, dos quais 25% são representados pela coroa

(Giacomelli, 1981). Entretanto, pode ocorrer significativa variação de peso, dependendo do cultivar.

### **2.3. Posição no mercado mundial e principais estados produtores**

O abacaxizeiro, originário das Américas, é cultivado na Ásia, na África e nas Américas (Norte, entral e Sul). A Tailândia, as Filipinas, o Brasil, a China e a Índia destacam-se como os principais países produtores (IBGE, 2003).

O Brasil, em 2002, ocupou a terceira posição como produtor mundial de abacaxi, produzindo 2,8 milhões de toneladas em 60.000 hectares plantados. Em termos nacionais, o Estado de Minas Gerais é o principal produtor (740.000 ton), seguido pela Paraíba (540.000 ton) e pelo Pará (440.000 ton) (IBGE, 2003).

Estima-se que a área de plantio de abacaxi seja de 5.000 hectares na região do Triângulo Mineiro, com a média de 2.500 a 3.000 hectares/ano e produção de 30 a 35 toneladas de fruta/hectare. No período de abril a setembro, as indústrias da região mineira e da região sul processam cerca de 60% da produção nacional de abacaxi (40% utilizados para o consumo “in natura”). No entanto, no período de outubro a março, o quadro se inverte com o consumo do abacaxi “in natura” chegando a quase 60% (Arantes, 2001).

### **2.4. Composição química do abacaxi**

A composição química do abacaxi varia muito de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a produção ocorre no período do verão e gera frutas com maior teor de açúcares e menor acidez, como pode ser visto na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição química média do abacaxi.

Componentes	Quantidade (por 100 gramas)
Glicídio	13,70
Proteínas	0,40 g
Lipídios	0,20 g
Cálcio	18,00 m
Ferro	0,50 mg
Fósforo	8,00 mg
Fibras	0,95 g
Niacina	0,82 mg
Ácido ascórbico	27,20 m
Tiamina	80,00 mcg
Riboflavina	128,00 mc
Retinol	5,00 mcg
Calorias	52,00 kcal

Fonte: FRANCO (1989).

O abacaxi destaca-se pelo valor energético, devido à sua alta composição de açúcares, e valor nutritivo pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B1, B2 e Niacina). No entanto, apresenta teor protéico e de gordura inferiores a 0,5% (Franco, 1989).

O fruto apresenta alto conteúdo em bromelina, que auxilia o processo de digestão. Trata-se de mistura de enzimas proteolíticas que em meio ácido, alcalino ou neutro, transforma as matérias albuminóides em proteases ou peptona. A bromelina pode ser isolada do suco da fruta ou do talo da planta, ocorrendo em maior concentração no cilindro central do abacaxi (Medina et al., 1987).



## 2.5. Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (Murachi, 1976).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (Cesar, 2005).

Segundo Baldini et. al. (1993), a bromelina é uma enzima sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica. Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos, e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática, de acordo com diversos autores citados em seu trabalho.

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc. Foi verificado por Rowan et. al. (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70 °C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60 °C e pH 7,0.

A forma de bromelina comercialmente encontrada é a obtida do talo, apesar da grande quantidade de resíduos do abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi (Cesar, 2005). As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidasas (Murachi, 1976).

Suh et. al. (1992) purificaram a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza, respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32.5 e 37 kDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. Murachi (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que a massa molar da fração pura era de 28 kDa, por SDS-PAGE. Rowan et. al. (1990) descrevem a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

César (2000) estudou a extração da bromelina utilizando sistema bifásico formados por PEG/sal (fosfato de potássio). Foram obtidos resultados favoráveis e promissores. Obteve-se o coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 com pH 9,0, PEG 1500 e concentração de 17,5% PEG e 15% de sal.

César (1999) realizou as análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. O fruto e talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. Foi observado que por meio da precipitação em um estágio com 80% (%v/v) de etanol a 5 °C, é possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5 vezes a atividade específica inicial.

## 2.6. Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina de ovo, é aquecida lentamente até 60 ° ou 70 ° C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. Isto é comum já que ocorre quando fervemos ovos em água. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e, aparentemente, de forma irreversível. Esse efeito do aquecimento ocorre virtualmente com todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provocá-lo varie. A mudança provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como *desnaturação* (Borracini, 2006).

Há outra importante consequência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma,

presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros (Borracini, 2006).

Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves (Yao et. al., 2002).

## **2.7. Proteína total, Atividade e Açúcares Redutores**

César (1999) realizou análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para caracterização do meio inicial. As concentrações e os resultados são mostrados nas Tabelas 2.2 e 2.3. A casca e o talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém a casca apresenta cerca de 50% menor quantidade de enzimas proteolíticas. O abacaxi utilizado para as análises foi o fruto maduro, por isso apresentou uma quantidade elevada de açúcares redutores expressos em glicose, 0,2 a 0,4 g/g de abacaxi. De qualquer forma, o talo e a casca do abacaxi maduro tem um teor de enzima considerável para recuperação, como é mostrado na Tabela 2.3, ainda mais tratando-se de resíduo de muitas indústrias de conservas.

Tabela 2.2 – Dados da concentração das amostras de polpa do fruto, casca e talo do abacaxi.

	Massa (g)	V <sub>água</sub> (mL)	V <sub>Total</sub> (mL)	Concentração
Fruto	1734,11	600	3420	507 g polpa/L
Casca	850,50	1000	1074	792 g casca/L
Talo	413,54	400	980	422 g talo/L

Tabela 2.3 – Dados de proteína total, atividade e açúcares redutores.

	Proteína total (mg/L)	Atividade enzimática (mg/g)	Açúcares redutores (U/L)
Fruto	1127,0	2,22	1428,5
Casca	842,3	1,06	865,0
Talo	893,7	2,12	431,5

## 2.8. Consumo de Bromelina

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo, pois vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços sem concorrência a princípio (Cesar, 2005).

A indústria de cervejas, onde a bromelina pode ser usada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando que esta enzima produz resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto (Borracini, 2006).

A concentração principal está na indústria farmacêutica brasileira. Além de ser uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo uma previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de US\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Reflexos do plano econômico que melhorou substancialmente o

poder aquisitivo dos brasileiros que estão investindo em saúde e medicamentos, o que vem refletindo no aumento da expectativa de vida, pois segundo o IBGE, o número de idosos atualmente é o dobro do registrado em 1980. A bromelina também é largamente utilizada em procedimentos técnicos de análises clínico-laboratoriais.

## 2.9. Separação e Purificação de Proteínas

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas com a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade.

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado *downstream processing*, é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância (Belter et al, 1998).

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (Asenjo, 1994).

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. As etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada. Os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas. Por isso, a extração líquido-líquido vem despertando tanto interesse a fim

de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo (Rabelo, 1999).

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido muito desenvolvidas nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (Hustedt et al, 1985).

## **2.10. Extração Líquido-Líquido**

Uma situação comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos do processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas.

Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (Rabelo, 1999).



## **2.11. Extração em duas Fases Aquosas**

### **2.11.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Na escolha de meios de extração para aplicações em biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área alguns parâmetros tais como solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Entre estes critérios deve-se citar (Porto, 1998):

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;
- Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- Ser possível de esterilizar;
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos e não ser inflamável.

Além disso, em processos de extração líquido-líquido aplicados a quaisquer sistemas, é imprescindível que os solventes escolhidos formem duas fases (sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis) e tenham densidades diferentes. Além destes fatores a separação entre as fases deve ser rápida.

Nos processos biotecnológicos, em que se opera com biomoléculas ou células, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. Assim, a introdução dos sistemas de duas fases aquosas em processos biotecnológicos é uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nestes processos, já que estes sistemas caracterizam-se por ajustar-se aos critérios requeridos pelos processos de bioseparações (Matiasson et al, 1987).

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade

de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e também provocam desnaturação das mesmas.

Sistemas de duas fases aquosas formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A fase mais leve é rica em polietileno glicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água e se separam em duas fases (Albertsson, 1986). Eles constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (Coimbra, 1995).

A separação espontânea, em fases distintas, devido à adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1986, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos. Devido a esta particularidade os sistemas de duas fases aquosas são empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, proteínas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares. De acordo com Albertsson, é possível ter uma separação bastante seletiva de substâncias usando sistemas aquosos de polímeros (Albertsson, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Dextrana e PEG-Sal têm sido, nos últimos anos, os mais freqüentemente estudados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (Diamond et al, 1992).

Albertsson (1971) reconheceu a possibilidade de utilizar-se sistemas de duas fases aquosas como um método de separação aplicado a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica. Além disso, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas, tais como, carga e hidrofobicidade. Assim, ao lado de trabalhos no campo tecnológico existe também o interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto, são aplicados os diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas existentes.

A variada faixa de aplicabilidade dos sistemas de duas fases aquosas tem estimulado o estudo a fim de estabelecer fundamentos para o trabalho nestes sistemas, além de identificar os mais adequados para a separação de diferentes biomoléculas. (Guan et al, 1993).

Albertsson (1971) comparou sistemas de duas fases aquosas com os solventes mais convencionais, de acordo com a natureza hidrofóbica, hidrofílica. A fase rica em sal é mais hidrofílica e a fase rica em PEG (polietilenoglicol) é mais hidrofóbica.

Considera-se que a separação de moléculas, incluindo proteínas, em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molecular dos compostos a serem particionados tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas.

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala (*scale up*) e o uso em processos contínuos. Com isto, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um

componente de elevado custo, e na operação em múltiplos estágios (Coimbra, 1995).

### 2.11.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas

Existem várias substâncias que podem formar duas ou mais fases aquosas ao se misturarem. Estas substâncias podem ser polímeros ou compostos de baixa massa molar, como os sais, que permitem a separação de fases.

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser divididos em quatro grandes grupos (Albertsson, 1986):

a) Dois polímeros não iônicos;

Exemplos: PEG/ ficoll, PEG/Dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana;

b) Um polieletrólito e um polímero não iônico;

Exemplos: sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/ metil celulose;

c) Dois polieletrólitos;

Exemplos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carbometildextrana de sódio/carboximetil clulose de sódio;

d) Um polímero não iônico e um composto de baixa massa molar;

Exemplo: polipropileno glicol/fofato de potássio, PEG/fofato de potássio, metoxipolietileno glicol/fofato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG / citrato de sódio;

Há ainda novos sistemas formados por PEG/ $\text{FeSO}_4$  e PEG/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fofato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a

concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (Pathak et al, 1991).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação ao sistema PEG/dextrana (Coimbra, 1995).

### **2.11.3. Polietileno Glicol**

O polietileno glicol,  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas de milhares de Daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras.

O PEG é também conhecido pelo nome comercial de poliglicol, dependendo da empresa que o fabrica. Para pesos moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuírem pesos moleculares menores que 1000 Da. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja

retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devida a liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (Coimbra, 1995).

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, *Food and Drug Administration*. Devido a sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. Devido às suas propriedades o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas. Ele pode formar um composto ativado PEG-proteína que mantém a proteína ativa e diminui consideravelmente a reação imune, além de aumentar o tempo de vida de soros sanguíneos. Ele pode ser ligado também a superfícies, formando uma camada protetora e biocompatível, para ser empregado em aparelhos de diagnósticos, substituição de artérias e dispositivos relacionados ao sangue. O “PEG protetor” pode ser usado também para evitar a adsorção de proteínas em análises bioquímicas de eletroforese por zona capilar, que é uma importante técnica analítica empregada em bioquímica. Além disso, o PEG pode ser usado com lipossomas para a liberação controlada e distribuição seletiva de medicamentos, pois os lipossomas sem o PEG podem ser rapidamente atacados e eliminados do corpo humano, sem cumprir a sua função. Por ser solúvel em muitos solventes orgânicos, o PEG pode ser utilizado para solubilizar enzimas neste meio sem desnaturá-las através da formação de uma camada protetora. Além disso, compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo, substratos de enzimas, cofatores, corantes, etc. (Harris, 1992).

#### **2.11.4. Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico**

Os fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas bifásicos aquoso do tipo polímero/Sal e, portanto, formam duas fases na presença do polímero. Além disto, apresentam um menor custo em relação à dextrana e maior facilidade de utilização industrial (Forciniti et. al, 1991).

O fosfato de potássio monobásico, que também é conhecido como fosfato diácido de potássio, tem massa molar 135,09 g/mol e sua fórmula molecular é  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25 °C seu pH fica entre 4,1 e 4,5. A sua cinética de dissolução em água é lenta, sendo necessário aquecer o sistema para dissolução total do sal a altas concentrações.

O fosfato de potássio dibásico anidro tem massa molar 171,18 g/mol e sua fórmula molecular é  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Em solução a 5% e temperatura de 25 °C seu pH fica entre 8,5 a 9,6 e apresenta cinética de dissolução em água mais rápida que o monobásico. Os sais de fosfato apresentam um baixo custo, por isso o seu grande uso em sistemas de duas fases aquosas.

#### **2.11.5. Recuperação de Sais e Polímeros**

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o *scale up*, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (Kroner et al, 1982).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (Hustedt et al, 1988).

As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (Coimbra, 1995).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é considerada um método geral para reciclagem de sais e para dessalinização da fase rica em PEG (Hustedt et al, 1988).

Sais também podem ser recuperados usando uma mistura álcool alifático – sal – água. Especificamente para separação de fosfato de potássio, um

resfriamento abaixo de 6 °C provoca a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (Papamichael et al, 1992, Coimbra, 1995).

Greve & Kula (1991) recentemente estudaram maneiras de reciclar a fase fosfato desses sistemas para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem de fase fosfato foi obtida pela sua separação através do uso de álcoois. O PEG da fase do topo rica em PEG pode também ser reciclado, como pode ser visto em alguns trabalhos de Kula e Hustedt, principalmente.

#### **2.11.6. Sistema PEG/Sal**

A formação de sistemas PEG/sal foi primeiramente observada por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos ainda não são bem explicados. Os sistemas PEG/dextrana já foram muito estudados, porém, nos últimos anos o enfoque principal está nos sistemas PEG/Sal. Eles foram introduzidos para a aplicação prática da separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menores custos, levando a uma separação mais rápida para os sistemas PEG/dextrana. A aplicação industrial de sistemas PEG/sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de separadores comerciais que permitam separações de proteínas continuamente e mais rapidamente (Kula, 1990 e Franco,1992).

Para sistemas PEG/sal, os efeitos de *salting out* parecem atuar aumentando o comprimento da linha de amarração, retirando as proteínas da fase salina para a fase rica em PEG, ou se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e *salting out* são dependentes das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (Kula,1982).



## 2.12. Diagrama de Fases

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % p/p.

A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada bifásica e abaixo monofásica. A Figura 2.1 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases.

A composição inicial do sistema é dada pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de “tie-line” ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N define uma nova linha de amarração.

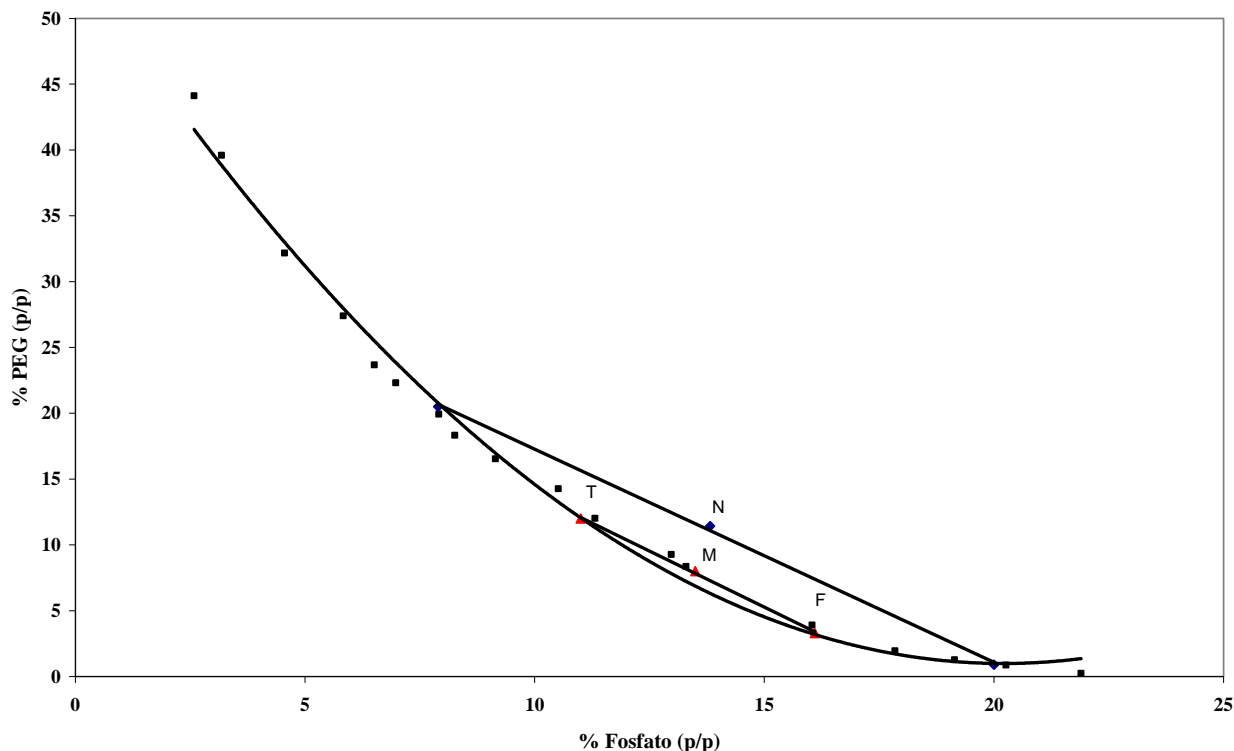


Figura 2.1 – Exemplo de um Diagrama de Fases.

### 2.13. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e consequentemente alteram o diagrama de fases são: massa molar do polímero, concentração dos componentes do sistema, pH e temperatura.

Quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que a massa molar do polímero aumenta. Para um sistema polímero-polímero (PEG/dextrana, por exemplo) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica à medida que a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros aumenta. A massa molar do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (Albertsson et al, 1994). Ele afeta também o comprimento da linha de amarração,

que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (Forciniti et al, 1991).

A concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes (Cesar, 2005).

A temperatura causa influência no diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, desloca a curva binodal e modifica também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa (Cesar, 2005).

O pH e o tipo de cátion também são variáveis que podem influenciar no diagrama de fases. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no efeito “salting out” do PEG (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a substituição de fosfato de potássio desloca a curva binodal para a direita, e portanto, a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do *salting in* do PEG (Cesar, 2005).

## 2.14. Fundamentos de Partição das Proteínas

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela bioengenharia e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas, renovou-se o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o *scale up*. Os fundamentos de partição de biomoléculas entre as duas fases ainda não são totalmente compreendidos.

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros quando adicionados num solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menos que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixa massa molar, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações de polímeros (Cesar, 2005).

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores tais quais: tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores, como (Baskir et al, 1989):

- Tipo dos polímeros que formam as fases: massa molar média, distribuição da massa molar, modificações químicas poliméricas.
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.

- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura

As condições adequadas para a partição devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores citados acima.

#### 2.14.1. Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição ( $K$ ) é uma grandeza que representa a relação de concentração da substância de interesse na fase superior e inferior depois de atingido o equilíbrio:

$$K = C_T / C_B \quad (2.1)$$

na qual

$C_T$  é a concentração da substância de interesse na fase superior no equilíbrio;

$C_B$  é a concentração da substância de interesse na fase inferior do equilíbrio;

O  $K$  é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o  $K$  está associado.

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas,

interações entre as pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (Albertsson, 1986).

#### **2.14.2. Influência da Massa Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição**

A massa molar do polímero influencia no valor de  $K$ . Em um sistema PEG/sal, se a massa molar do PEG for elevado, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso a massa molar do PEG seja baixa, ocorrerá o oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: se a massa molar do PEG for elevada e a da dextrana for baixa, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar.

A massa molar da substância a ser separada também influencia em  $K$ , pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com pesos moleculares muito diferentes (Johansson, 1994; Albertsson, 1986; Yang et al, 1994).

O  $K$  depende também da massa molar da proteína. Ele diminui com o aumento da massa molar e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixa massa molar e tende a ficar estável para PEG com alta massa molar (Albertsson, 1986; Forciniti et al, 1991). O tipo de proteína também influi no valor de  $K$ , porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da seqüência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (Schluck et al., 1995).

### **2.14.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição**

Outro fator importante que influencia o  $K$  é o pH do sistema. Alterando-se o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (pI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos. (Forciniti et al, 1991).

### **2.14.4. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição**

Para o entendimento da influência de alguns fatores em  $K$ , é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positivamente e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde ela está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (Schmidt et al, 1996).

#### **2.14.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição**

A concentração dos componentes do sistema e portanto, o comprimento da linha de amarração, também afetam o  $K$ . Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de  $K$  é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de  $K$  será maior ou menor que 1, dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de  $K$  diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou  $K$  pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o  $K$  é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em  $K$  é maior em proteínas com alta massa molar. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior e a um valor praticamente constante na fase superior, favorecendo o efeito do *salting-out* da fase rica em sal para a fase rica em PEG (Bamberger et al, 1985; Albertsson, 1986; Minami, 1997).



#### **2.14.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição**

O  $K$  depende também da concentração da proteína presente na amostra. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas (de preferência menores que 1 g/L), pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína devido à presença de PEG (Schmidt et al, 1996).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água. Com isso, o valor de  $K$  poderá mudar (Minami, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, consequentemente, o valor de  $K$  (Guan et al, 1994).

#### **2.15. Tempo de Separação das Fases**

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (Coimbra, 1995).

Outro fator que também influencia o tempo de separação é a velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre a formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (Bamberger et al, 1985).

A posição em relação ao ponto crítico também exerce influência no tempo de separação das fases. Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a uma pequena diferença de densidade. Já no caso dos sistemas muito distantes do ponto crítico, a viscosidade aumenta devido ao aumento da concentração do polímero, tornando a separação de fases mais lenta.

## **2.16. Equação do Coeficiente de Partição**

Como o valor de  $K$  depende de diversos fatores, o desenvolvimento de um modelo para predizê-lo torna-se específico para um tipo de sistema ou substância. Existem vários trabalhos para o desenvolvimento de equações que possam prever o valor de  $K$ , mas que são específicas (Asenjo et al, 1994, Eiteman et al, 1994).

Segundo Albertsson (1986), podem existir, na partição de substâncias, cinco fatores diferentes que podem atuar separadamente (predominância de um fator em relação aos outros) ou em conjunto de acordo com o tipo de substância e do sistema de fases. São eles:

- Fator do tamanho, que existe quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas;
- Fator eletroquímico, que surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;

- Fator de afinidade hidrofóbica, que é a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fases para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;
- Fator de afinidade bioespecífica, que utiliza a afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação e fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

Esses fatores podem ser agrupados na seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eleto} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf} + \ln K_{hifob} \quad (2.2)$$

sendo:

$K_{eleto}$  é o fator eletroquímico;

$K_{hifob}$  é o fator de afinidade hidrofóbica;

$K_{bioesp}$  é o fator de afinidade bioespecífica;

$K_{tam}$  é o fator do tamanho;

$K_{conf}$  é o fator de conformação;

$K^0$  é o valor inicial do  $K$ .

## 2.17. Aplicações do SBA em Larga escala

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com sistemas bifásicos aquosos em escala laboratorial para a separação de proteínas, organelas celulares, vírus e outros materiais biológicos. A aplicação de sistemas bifásicos para a partição de proteínas em larga escala também tem sido demonstrada, nos últimos anos, através da utilização de centrífugas e extratores (Diamond & Hsu, 1992; Walter et al, 1986).

A extração bifásica aquosa exibe inúmeras vantagens sobre outros métodos de separação e recuperação. De acordo com Albertsson (1986) e

Walter et al, (1986), as principais vantagens da aplicação dos sistemas bifásicos aquosos são:

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;
- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- Possibilidade de operação em contínuo e possibilidade de operação à temperatura ambiente sendo mais econômico que outros processos de separação.

As operações envolvendo os sistemas bifásicos aquosos são, de um modo geral, facilmente executadas em qualquer escala técnica. Isto se deve principalmente a rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases permitindo um coeficiente de partição constante devido à baixa tensão interfacial destes sistemas, a simplicidade das unidades de operação e a disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (Cabral & Aires-Barros, 1993). Em particular, a facilidade em se obter o *scale up* pode ser demonstrado pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados na literatura. Para facilitar a utilização destes sistemas de escala laboratorial para larga escala, no entanto, faz-se necessário a caracterização do sistema bifásico adequado para a partição de uma determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (Diamond & Hsu, 1992).

Assim, quando se deseja isolar uma determinada proteína de uma mistura complexa, torna-se essencial encontrar condições ideais. Isto é realizado normalmente, conforme descrito anteriormente, via experimentos em escala laboratorial, para então se realizar o *scale up*. Para se obter o projeto de um experimento, é importante otimizar o rendimento e a partição *versus* o restante dos componentes da mistura, isto é, o fator de purificação. A grande vantagem é que os componentes que podem prejudicar os passos de purificação são removidos sem a necessidade da utilização de centrifugações e

filtrações por membranas. Ainda, a partição espontânea de proteínas reside no fato de que o material contaminante é facilmente removido em um só passo. Sob condições favoráveis, é possível atingir-se um elevado fator de purificação no primeiro passo de extração (Matiasson & Ling, 1987).

Resultados obtidos com a taumatina (proteína com propriedades adoçantes), revelara, em um único passo de extração com sistema bifásico PEG – 6000/ Fosfato contendo NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, valores de rendimento e fator de purificação de 90-95% e 20, respectivamente (Cascone et al, 1991).

Estudos realizados por Kroner et al (1982) estabeleceram uma comparação entre os processos de purificação utilizando os sistemas de duas fases aquosas e um processo convencional constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos e obtiveram graus de pureza semelhantes, atingindo um rendimento superior no protocolo de extração líquido-líquido (71% *versus* 51%). Uma análise econômica comparativa entre os dois processos, envolvendo custo de pessoal, material e operação revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha um custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações seqüenciais em sistemas de duas fases aquosas.

## **2.18. Aspectos econômicos**

A escolha entre os diferentes métodos de separação é feita de acordo com aspectos econômicos e com as características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada.

O conhecimento em sistemas bifásicos aquosos e suas habilidades de partição de moléculas biológicas têm sido estudados por mais de 40 anos. Desde então, o interesse nesta área mostrou-se reduzido até os últimos anos, quando

uma série de pesquisas tomou lugar dentro do mundo científico (Matiasson & Ling, 1987).

A extração de proteínas em sistemas bifásicos aquosos consiste num processo que requer um custo relativamente alto de reagentes, como, por exemplo, a dextrana, em comparação com outros processos. Uma análise econômica da recuperação e purificação da enzima formato desidrogenase a partir de *Candida biondii* demonstrou que o uso de sistemas bifásicos aquosos possui vantagens econômicas quando comparado a outros métodos. O tempo de operação reduzido, que influi diretamente nos custos de energia, constitui o maior fator do baixo custo operacional da partição com sistemas bifásicos aquosos (Cabral & Aires-Barros, 1993).

O custo operacional, por sua vez, está extremamente relacionado com o tipo e concentração dos polímeros necessários para a formação das fases do sistema e sua capacidade. Conforme mencionado anteriormente, o preço dos polímeros mais empregados, como a Dextrana, é bastante elevado, embora o sistema PEG-Dextrana possua características importantes como a biodegradabilidade, além de reunir uma elevada gama de informações sobre a partição de vários compostos ao longo dos anos. O uso prático da Dextrana apenas seria justificado em casos raros, como na produção de produtos especiais (Matiasson & Ling, 1987). Para combater este problema, tem-se recorrido ao Hidroxipropilamido, similar a Dextrana e mais econômico.

Kroner et al (1984) verificaram que esta técnica de extração não deixa de ser competitiva com outras técnicas como a centrifugação, filtração com tambor e filtração com membranas. Estes autores obtiveram, igualmente, um elevado consumo de reagentes, cerca de 53% do custo total, embora estes custos tenham sido compensados pelo baixo custo observado para o consumo energético e para o investimento em equipamento.

Por estes fatos, torna-se fundamental reduzir substancialmente os custos dos reagentes químicos a serem utilizados na partição, quer pelo recurso a novos reagentes, quer pela implementação de técnicas de recirculação de

reagentes. Por isso, neste trabalho, o uso de Sais de fosfato, focando em sua abundância e preço acessível.

## CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação II, DESQ/FEQ/UNICAMP.

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Reagentes

– Constituintes do sistema de duas fases aquosas.

Foram utilizados polietileno glicol (PEG) de diferentes pesos moleculares, PEG 1500 e 4000, sendo o PEG 1500 fornecido pela Synth e o PEG 4000 pela VETEC Química Fina (Rio de Janeiro).

Os sais utilizados foram o Fosfato de Potássio monobásico anidro P.A, de fórmula molecular  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e massa molar de 136,09 g/mol, e Fosfato de Potássio bibásico anidro P.A, de fórmula molecular  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e massa molar de 174,18 g/mol, ambos fornecidos pela Synth (São Paulo).

– Constituintes das soluções utilizadas para a determinação da atividade enzimática e quantidade total de proteínas.

#### 1) Reagente do biureto:

Foram utilizados para o preparo do reagente de biureto sulfato de cobre pentaidratado, tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio.

O tartarato duplo de sódio e potássio possui fórmula molecular  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , massa molar de 282,22 g/mol e foi fornecido pela Synth.



O hidróxido de sódio possui fórmula molecular NaOH, massa molar de 40 g/mol e foi fornecido pela Quimex.

2) Solução padrão de proteína:

Foi utilizada a proteína padrão albumina de soro bovino (BSA) de massa molar 66.500-67.500 Da (ponto isoelétrico 5,1) obtida da Sigma Chemical.

3) Reagente de Bradford:

Foram utilizados para o preparo do Reagente de Bradford *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de fórmula molecular  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ , fornecido pela VETEC, Álcool Etílico 99,5% de pureza, de massa molar 46,07 g/mol, fornecido pela Ecibra e Ácido o-fosfórico 85%, de fórmula molecular  $H_3PO_4$ , massa molar de 98 g/mol, fornecido pela Synth.

4) Solução de NaOH 1 M

O reagente hidróxido de Sódio foi fornecido pela Synth (São Paulo).

### 3.1.2. Equipamentos

- Liquidificador Walita Twist.
- Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200.
- Agitador Biomatic, modelo 1005.
- pHmêtro Analyser pH 300.
- Agitador magnético com aquecimento NOVA ÉTICA, modelo 119, potência: 300 W, RPM: 3000.

- Banho termostatzado FANEM, modelo 100.
- Estufa de secagem.
- Micropipetas automáticas.
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 21D.

### **3.2. Métodos**

#### **3.2.1. Preparo das amostras**

##### **3.2.1.1. Preparação da amostra a partir do fruto do abacaxi**

Prepararam-se as amostras com a polpa do abacaxi pérola através da seguinte etapas:

- 1) Moagem da casca e talo em liquidificador em velocidade baixa, por 5 min, a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$ ) °C, com adição de água em alguns casos e outros foram utilizados tampões previamente preparados.
- 2) Filtração em tela de Nylon para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.
- 3) Acondicionamento à temperatura de  $-5$  °C.

##### **3.2.1.2. Preparo do reativo de biureto**

Dissolveu-se em 500 mL de água destilada :

- 1,5 g de sulfato de cobre pentaidratado
- 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio

Adicionaram-se 300 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% com constante agitação. Adicionou-se água destilada suficiente para 1 Litro de solução (Departamento de Bioquímica, UFPR, 2005).

#### **3.2.1.3. Preparo da solução padrão de proteína**

Pesou-se 0,5 g de albumina de soro bovino e dissolveram-se em 100 mL de tampão fosfato pHs de 6 a 11.

#### **3.2.1.4. Preparo do Reagente de Bradford**

Dissolveu-se 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol 95% (47,73 mL de etanol 99,5% + 2,26 mL de água). A esta solução em agitação, adicionaram-se 100mL de ácido fosfórico 85%.

Agitou-se a solução por mais 2 horas e completou-se o volume para 1 L com água deionizada. Deixou-se agitar por 12 horas.

Filtrou-se o reagente (papel de filtro para filtração rápida – qualitativo 80 g) em frasco coberto com papel alumínio. Deixou-se em repouso na geladeira por 24 horas antes de utilizar (Bradford, 1976).

Obs.: Em todas as etapas, manteve-se o reagente coberto com papel alumínio para evitar que o *Coomassie Blue* reaja com a luz.

#### **3.2.1.5. Preparo das soluções de PEG**

Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se as duas massas molares de PEG usados (1500 e 4000 Da) até se obter concentrações a 50% (p/p).

#### **3.2.1.6. Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico.**

As soluções foram preparadas dissolvendo-se os sais de fosfato sólidos em certa quantidade de água deionizada, até atingir a concentração desejada, que foi de 15 % (p/p). Para o fosfato de potássio bibásico, pesou-se certa quantidade de

sal em balança. Anteriormente este foi seco em estufa para a retirada total da umidade. Completou-se com água deionizada até atingir a massa de desejada para se obter a concentração de 15% (p/p). A solução foi agitada no agitador magnético com aquecimento até a dissolução total do sal. O mesmo procedimento foi feito para o fosfato de potássio monobásico.

#### **3.2.1.7. Preparo da solução de KOH 1 M**

Pesou-se 2 g de hidróxido de potássio em balança eletrônica e completou com água até atingir a massa total de 50 g. A solução foi agitada no agitador magnético com aquecimento até a dissolução total do sal.

#### **3.2.1.8. Preparo dos Tampões**

Foram preparadas as soluções tampão pH 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 a partir de soluções de fosfato de potássio mono e dibásico a 15% (p/p), seguindo a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995). Para isto, prepararam-se soluções padrão de fosfato de potássio monobásico (solução A) e fosfato de potássio bibásico (solução B). Misturou-se em um béquer, contendo um eletrodo de cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir o pH desejado. Para os pHs 10 e 11, usou-se uma solução de KOH 1 M para o ajuste do pH dos tampões.

#### **3.2.2. Determinação da temperatura ótima**

Com o pH fixado em 7,0, foram feitos ensaios em batelada para se medir a atividade enzimática e quantidade de Proteínas Totais em amostras a diversas temperaturas, do seguinte modo:

Em vários tubos foram colocados 5 mL de solução de BSA 5g/L em várias temperaturas. Essa solução foi deixada 10 minutos para estabilizar a temperatura no biorrretor. As temperaturas foram: 5, 10, 25, 35, 45 e 55 °C. Os tubos foram devidamente numerados e cuidadosamente mantidos a temperatura desejada.

Com o pH fixado e com as variações de temperatura de cada amostra do suco do abacaxi foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o seguinte procedimento:

### **Procedimento**

Colocaram-se 5 mL de BSA (Soro Albumina Bovina) em um tubo, adicionou-se 1 mL de enzima (suco do abacaxi) para cada temperatura em estudo. Em seguida o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, esta amostra foi colocada em um outro tubo e adicionou-se 5 mL de biureto, imediatamente.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos na temperatura desejada e depois desse tempo retirou-se outra amostra e seguiu-se o mesmo procedimento anterior.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso da amostra, para que esta se estabilizasse. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

### **3.2.3. Determinação do pH ótimo**

Com a temperatura ótima fixada obtida pelos ensaios anteriores, foi possível também, pelas análises de Atividade enzimática e Proteínas totais se obter o pH ótimo da enzima, de acordo com o seguinte procedimento:

### **Procedimento**

Foram adicionadas ao suco do abacaxi soluções tampões para que se obtivessem os pHs desejados, que foram: 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,0; 7,5; 8,5 e 9,5.

Com isso, o mesmo procedimento seguido para a retirada das amostras para análise no caso da determinação da temperatura ótima foi seguido para o pH ótimo.

Colocaram-se 5 mL de BSA (Soro Albumina Bovina) em um tubo, adicionou-se 1 mL de enzima (suco do abacaxi) para cada pH em estudo. Em seguida o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, esta amostra foi colocada em um outro tubo e adicionou-se 5 mL de biureto, imediatamente.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos na temperatura desejada e depois desse tempo retirou-se outra amostra e seguiu-se o mesmo procedimento anterior.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso da amostra, para que esta se estabilizasse. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Para o cálculo da atividade enzimática ou específica utilizamos a equação (3.1), (Lopes, 2005).

$$AE = \frac{V_{reator} (Litros) * 10^6 (\mu mol / mL)}{MM_{BSA} * V_{enzima} (mL) * t_{reação} (min)} \quad (3.1)$$

Usou-se como base matemática para obtenção dos modelos cinéticos a equação de Michaelis-Menten (equação 3.2).

$$V_0 = \frac{V_{máx} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.2)$$

sendo que  $V_{max}$  é a velocidade máxima da reação,  $K_m$  é a constante de Michaelis–Menten e  $[S]$  a concentração do substrato. Seus parâmetros são encontrados pelo modelo M-M linearizado (equação 3.3), de acordo com Lineweaver-Burk (Halpern, 1997; Morris, 1972; Peter *et al*, 1987).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \quad (3.3)$$

#### 3.2.4. Procedimento para a obtenção das binodais

Segundo a metodologia proposta por Albertsson (1971), os diagramas de fases foram estabelecidos pelo método da turbidez, que é uma observação direta anterior ao aparecimento de uma segunda fase.

Em tubos de ensaio foram colocados uma certa quantidade de sal com posterior gotejamento da solução de PEG, para isso utilizou-se uma balança analítica ( $10^{-3}$  g) e um vórtex para pesagem e agitação dos tubos, respectivamente. O mesmo procedimento foi usado para obtenção dos pontos com alta concentração de PEG. A construção dos diagramas de fases foi a partir das diferentes composições das soluções de PEG e sal em temperatura ambiente. Concentrações de 50% (p/p) foram preparadas para PEG 1500 e 4000, respectivamente. A 15% a solução estoque do sal fosfato foi também preparada de forma a obter os pHs desejados (6, 7, 8 e 9). Para os pHs 10 e 11 além dos sais, foi utilizado uma solução de NaOH 1 M para ajuste. As diferentes composições permitiram a construção da curva binodal do sistema para cada massa molar de PEG em cada pH. Por convenção, a concentração do sal (% sal fosfato) que se distribui preferencialmente na fase inferior foi plotada na abscissa e a concentração do PEG (% PEG) que se distribui preferencialmente na fase superior foi plotada na ordenada.

#### 3.2.5. Obtenção das “tie-lines”

Os pontos que deram origem às “tie-lines” foram obtidos em tubos graduados de 15 mL, onde foram colocadas quantidades de soluções de PEG utilizada a 50% (p/p) e solução de sal fosfato nos pHs estudados, tais que

observasse a formação das fases superior e inferior com volumes iguais. Todos os pontos encontrados foram repetidos 3 vezes. Para cada sistema PEG/Sal a pH e massa molar do polímero variado, foram encontrados três pontos os quais ao passarem por um tratamento pelo método dos mínimos quadrados geraram a reta chamada “tie-line” (linha de amarração).

### 3.2.6. Metodologia de obtenção do coeficiente de partição da enzima bromelina.

Cada ponto das linhas de amarração foi reproduzido em tubos graduados com massa total do sistema entre 6 e 8 g. A estes tubos foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta automática o extrato bruto do abacaxi, tamponado nos pHs de 6 a 11, na fase inferior do sistema. Assim que o equilíbrio atingiu o equilíbrio difusivo (entre 12 e 24 horas), coletou-se 1 mL de amostra de cada fase. A determinação da concentração de proteínas totais nas fases inferior e superior foi realizada através do Método do biureto. A atividade enzimática foi determinada pelo método do Biureto. Dividindo os valores das concentrações de proteína da fase superior ( $C_T$ ) pela da fase inferior ( $C_F$ ), obteve-se o chamado coeficiente de partição ( $K$ ) do sistema bifásico aquoso em estudo, conforme a equação 3.4.

$$K = \frac{\text{Concentração de bromelina na fase superior}}{\text{Concentração de bromelina na fase inferior}} \quad (3.4)$$

Para o cálculo dos parâmetros  $K_{\text{prot}}$ ,  $K_{\text{ativ}}$  e FP, importantes para a análise dos resultados, utilizaram-se as equações 3.5, 3.6 e 3.7, respectivamente.

$$K_{\text{prot}} = \frac{\text{Proteína}(FL)}{\text{Proteína}(FP)} \quad (3.5)$$

$$K_{\text{ativ}} = \frac{\text{Atividade}(FL)}{\text{Atividade}(FP)} \quad (3.6)$$



$$FP = \frac{AE(FL)}{AE(Bruta)} \quad (3.7)$$

Sendo:

- Proteína bruta (mg) = Produto do volume (em mL) que foi usado da solução de proteína (amostra bruta no tampão) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

- Proteína leve = Produto do volume da fase leve (para cada “tie-line” e pH) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

- Proteína pesada = Produto do volume da fase pesada (para cada “tie-line” e pH) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

Atividade bruta (U) = Produto do volume que foi usado da solução de bromelina (volume de amostra bruta no tampão e em cada “tie-line” específica) pela atividade medida de bromelina neste tampão (em U/mL).

Atividade leve = Produto do volume da fase leve (para cada tie line e pH) pela atividade medida na fase leve.

Atividade pesada = Produto do volume da fase pesada (para cada “tie-line” e pH) pela atividade medida na fase pesada.

### 3.2.7. Calibração do espectrofotômetro

Num tubo adicionou-se 1 mL de água e 5 mL de biureto, que corresponde ao Branco. Em seguida colocou-se esta solução numa cubeta e leu-se no espectrofotômetro num comprimento de onda de 540 nm. Para esta amostra os valores da Transmitância e da Absorbância devem ser 100 e 0, respectivamente. Para a calibração do equipamento utilizando-se reagente de Bradford, o mesmo procedimento é feito, somente ao invés de biureto é adicionado 5 mL de Reagente de Bradford e a leitura é feita em 595 nm.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 4.1 mostra o efeito do pH sobre a atividade da bromelina da casca e talo do abacaxi. Os resultados permitem afirmar que a atividade foi afetada na faixa de pH estudado. Observou-se que os valores do pH ótimos da bromelina foram 4,5 e 7,0 onde apresentaram o máximo de atividade. Esses pHs correspondem aos pHs ótimos citados por Rowan et al. (1990), Rasheedi et al. (2003) e Ko et al. (1990). No entanto, Khan et al. (2003) encontraram o pH ótimo de 6,0.

O pH é um parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de  $H^+$  (Ricardo e Teixeira, 1993).

Estes dados são de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado. (Santana, 2006).

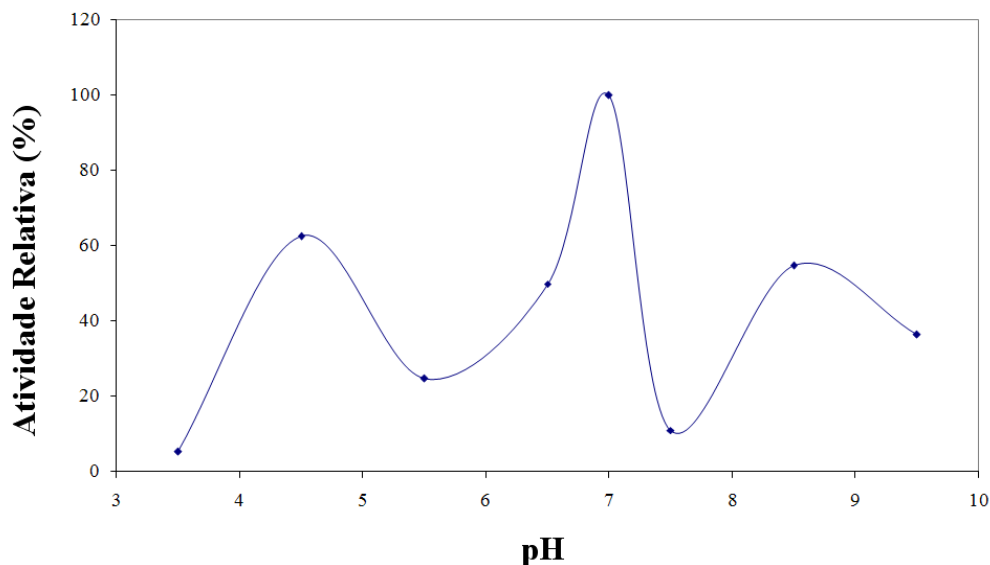


Figura 4.1 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica das bromelinas da casca e do talo do abacaxi.

A temperatura é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (Halpern, 1997).

A Figura 4.2 descreve o perfil da atividade proteolítica da enzima bromelina a diferentes temperaturas. Percebeu-se que a atividade foi baixa de 10 a 25 °C. A 30 °C houve uma elevação significativa da atividade, que permaneceu até 40 °C, apresentando sua faixa de melhor aplicabilidade entre 30 e 40 °C.

Rowan et al. (1990) e Such et al. (1992) caracterizaram a bromelina do talo, que apresentou atividade máxima a 60 °C. Rasheedi et al. (2003) também caracterizaram a bromelina do talo e encontraram temperatura ótima de 37 °C. Do mesmo modo, Khan et al. (2003) encontraram temperatura ótima de 37 °C. No entanto, Ko et al. (1990) encontraram temperatura ótima de 62,5 °C.

De modo geral, a literatura afirma que, temperaturas elevadas de uma ou duas dezenas de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, conduzem freqüentemente, à perda de atividade (Halpern, 1997). Isso pôde ser verificado na Figura 4.2.

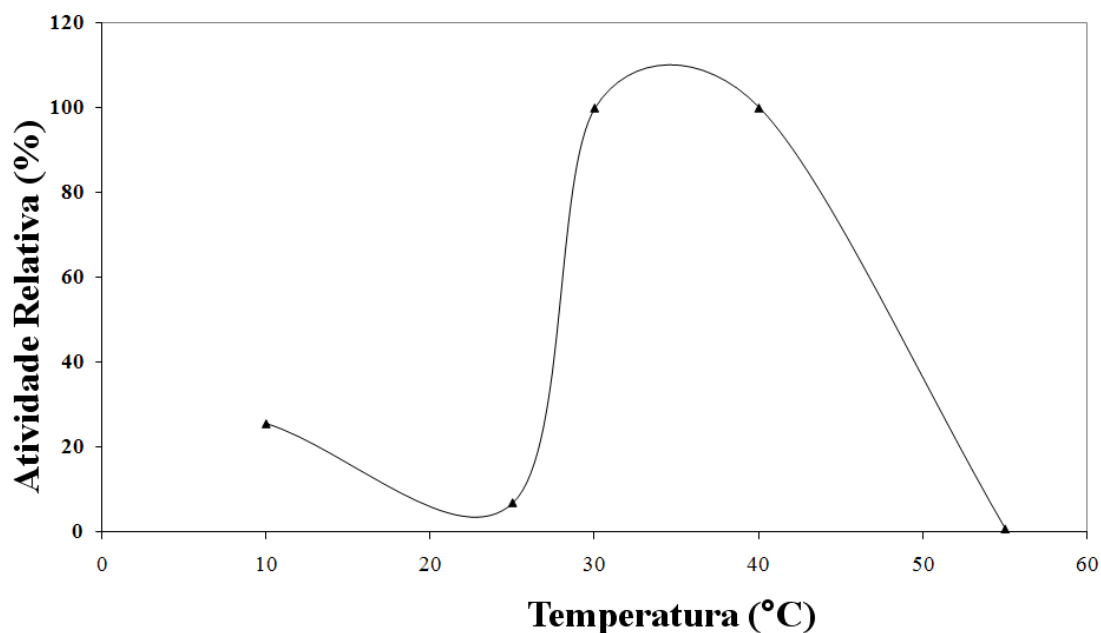


Figura 4.2 – Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica das bromelinas da casca e do talo do abacaxi.

#### 4.1. Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por bromelina da casca e talo do abacaxi

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 7,0 numa temperatura de 37 °C e os dados obtidos experimentalmente permitiram a obtenção da curva cinética, conforme a Figura 4.3, que mostra a influência da concentração do substrato na velocidade de hidrólise de BSA por bromelina da casca e talo do abacaxi.

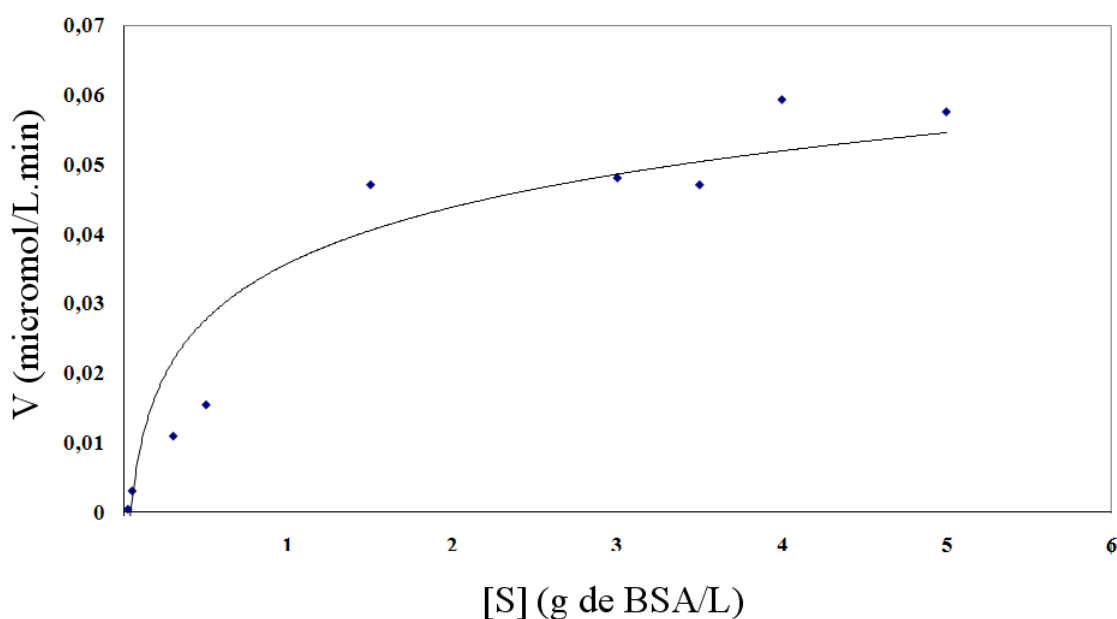


Figura 4.3 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas do talo e casca do abacaxi.

A Figura 4.4 é a linearização dos dados cinéticos de acordo com a metodologia de Lineweaver-Burk. Ajustando-se os dados experimentais ao modelo mostrado na equação 3.3 tem-se que o valor da constante  $K_m$  foi 0,3304 g/L e o valor de  $V_{max}$  foi 0,03789 micromol de BSA/L.min. O  $K_m$  corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima.

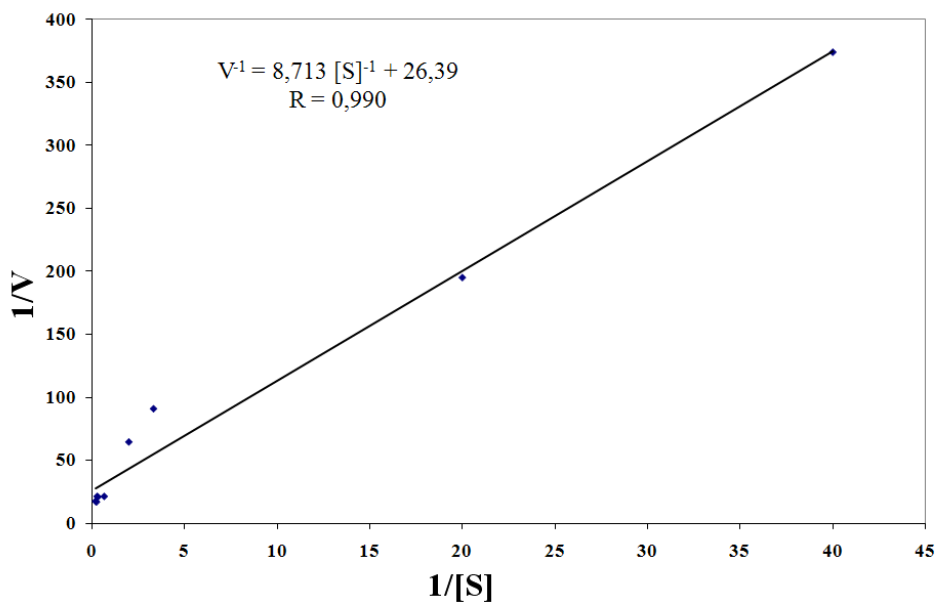


Figura 4.4 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk.

## 4.2. Determinação do diagrama de fases

A recuperação e purificação de produtos biológicos é uma das áreas da biotecnologia que tem despertado maior interesse atualmente. Dentre as técnicas empregadas para recuperação de produtos biológicos, a extração com sistemas bifásicos aquosos é uma das mais atrativas, dadas as condições suaves que oferece as moléculas e partículas biológicas (Albertsson et al., 1990; Christian et al., 1998).

Para a caracterização dos sistemas bifásicos formados por PEG/Sal, é necessária, primeiramente, a determinação do Diagrama de Fases. Este consiste de informações importantes como concentração do PEG e Sal necessárias à formação das fases, composição das fases em equilíbrio e previsão qualitativa da partição de moléculas.

#### 4.2.1. Efeito do pH sobre o diagrama de fases

A escolha do PEG se deve à boa eficiência do mesmo de formar fases em meio aquoso e não provocar a diminuição da atividade das biomoléculas, além de ser biodegradável e atóxico. Embora existam diversos sais que formem duas fases com o PEG, foi escolhido neste trabalho o sal fosfato de potássio por apresentar alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais, tais como: NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, além de ser uma boa alternativa de baixo custo aos processos convencionais, que utilizam a dextrana.

Os diagramas de fases PEG 1500/sal fosfato e PEG 4000/sal fosfato em pHs variando de 6 a 11 são mostrados nas Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente. Analisando o comportamento dos sistemas em diferentes valores de pHs, notou-se que não houve um deslocamento significativo das binodais.

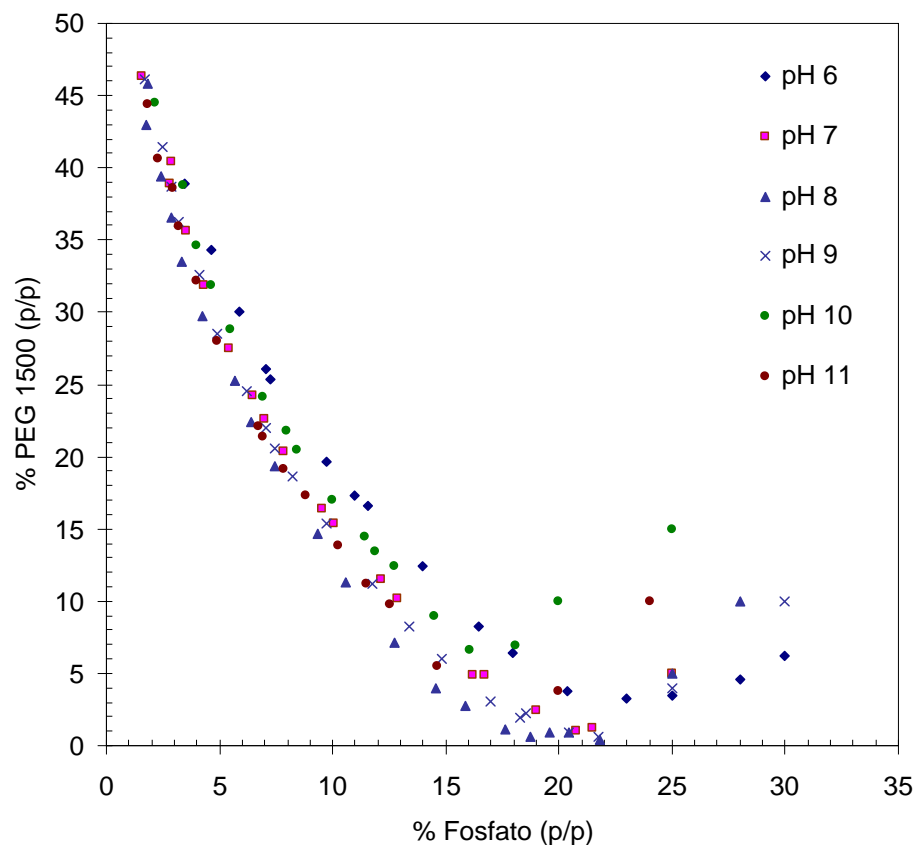


Figura 4.5 - Curva de equilíbrio SBA PEG1500/Fosfato.

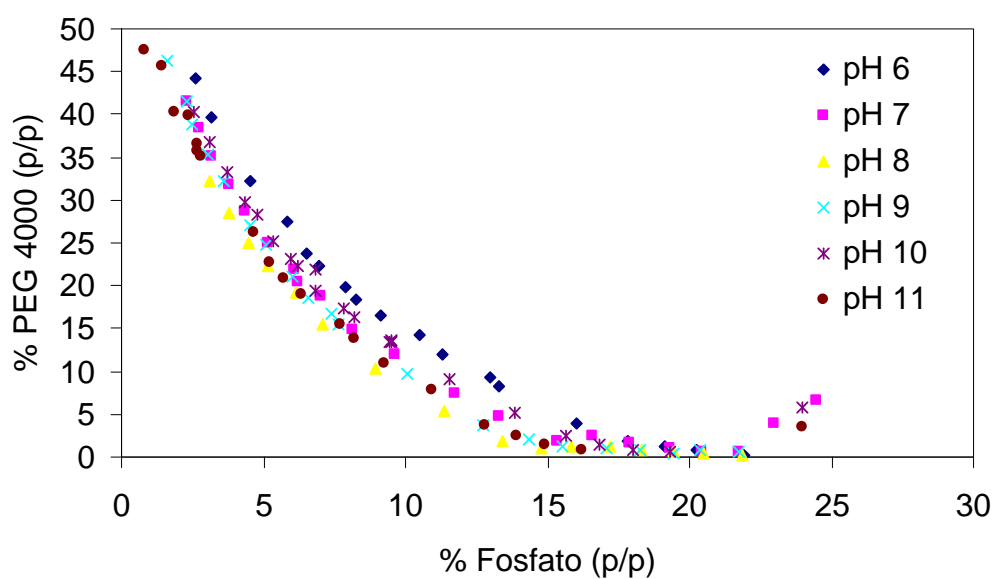


Figura 4.6 - Curva de equilíbrio SBA PEG4000/Fosfato.

Para os sistemas bifásicos PEG/Sais de fosfato estudados por Videira & Aires-Barros (1994), quando o pH diminui, a proporção de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta e devido à rejeição do PEG por grupos (ânions) multivalentes uma maior concentração de sal e/ou polímero será necessária para obter um sistema bifásico. Eles observaram que para sistemas bifásicos PEG/sal fosfato, a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração de polímeros e sais requeridos para a formação de fase.

No entanto, pôde-se verificar que a influência dos pHs sobre os SBAs não apresentaram comportamento definido neste trabalho, ou seja, o deslocamento das binodais seguindo uma tendência. Para isso é necessário um estudo mais aprofundado desses sistemas, embora em trabalhos anteriores, os autores demonstraram que esses efeitos sobre os SBAs não possuem uma característica própria (Diamond and Hsu, 1992).

Em relação à massa molar do PEG, segundo Albertsson (1971), quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases. Isso corrobora com as Figuras 4.7 a 4.12 que apresentaram maiores concentrações de PEG 1500 em relação ao PEG 4000.

A caracterização destes sistemas possibilita obter as linhas de amarração para que se possa purificar biomoléculas, como proteínas e enzimas em seu pH ótimo.



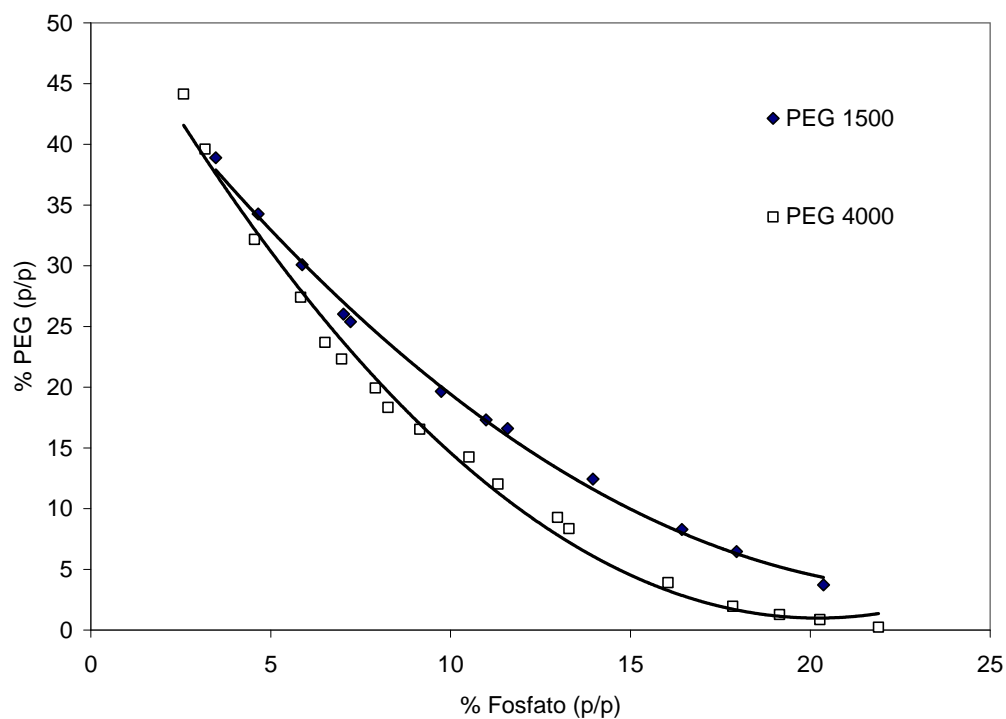


Figura 4.7 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 6,0.

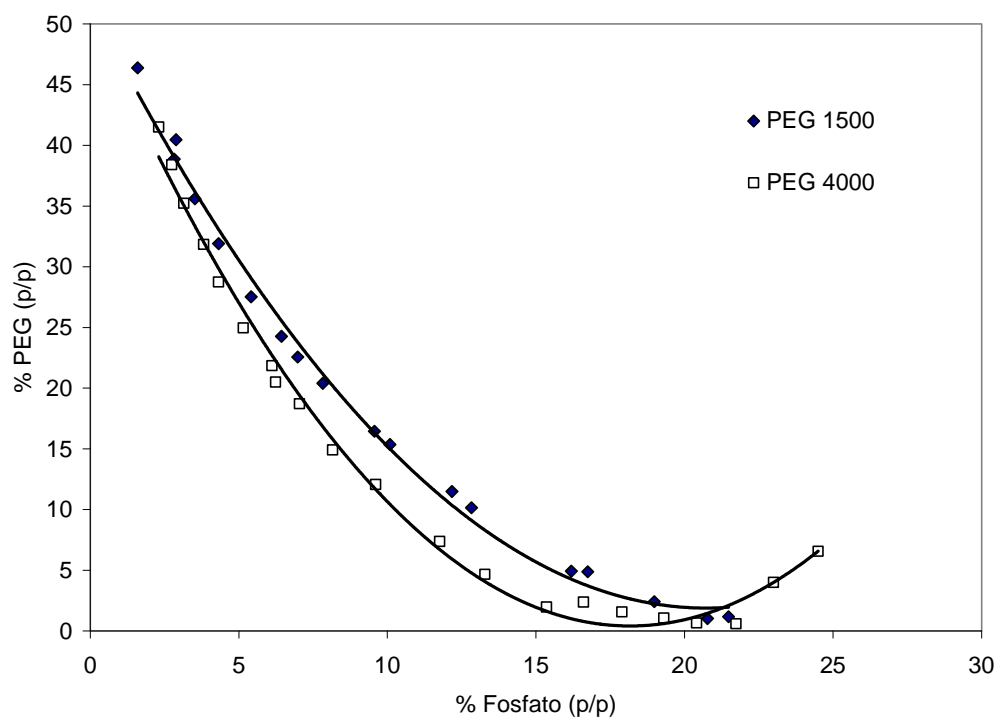


Figura 4.8 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 7,0.

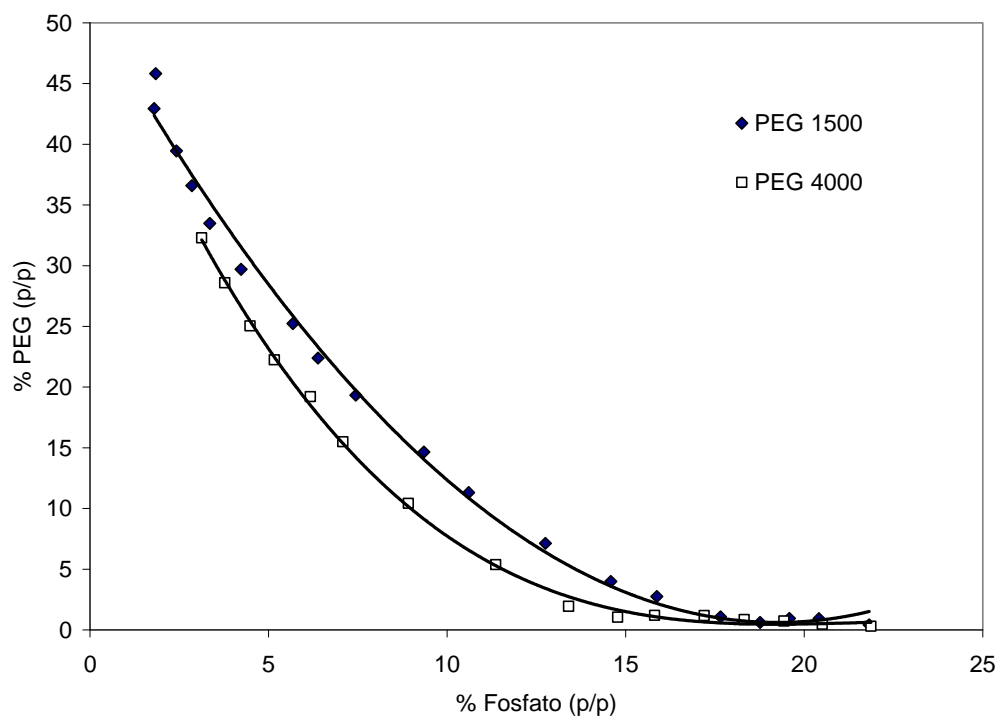


Figura 4.9 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 8,0.

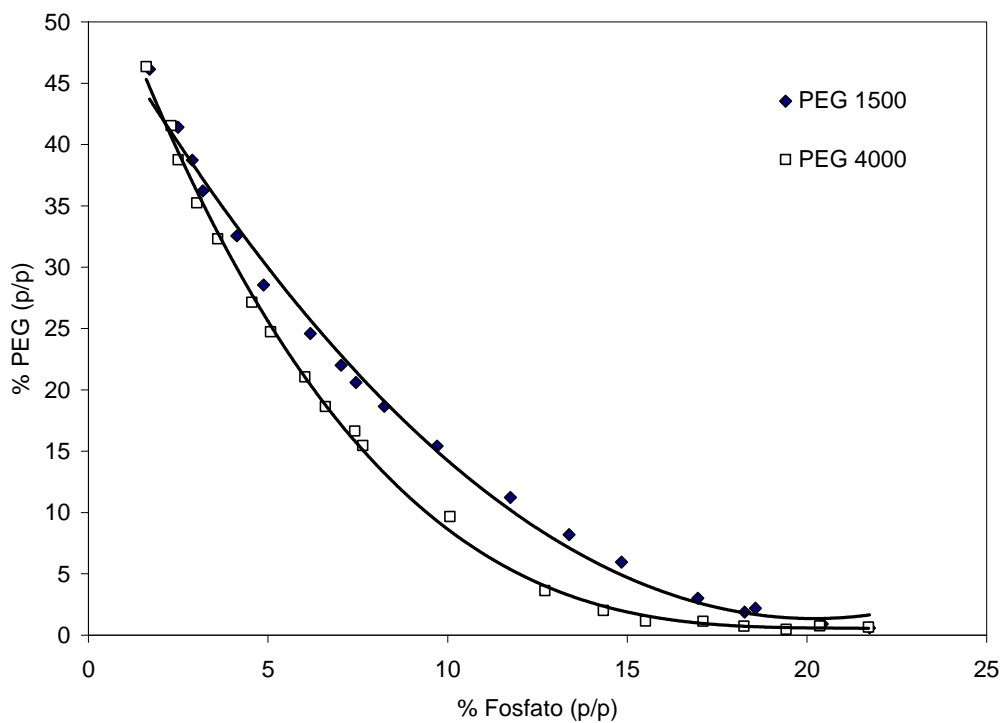


Figura 4.10 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 9,0.

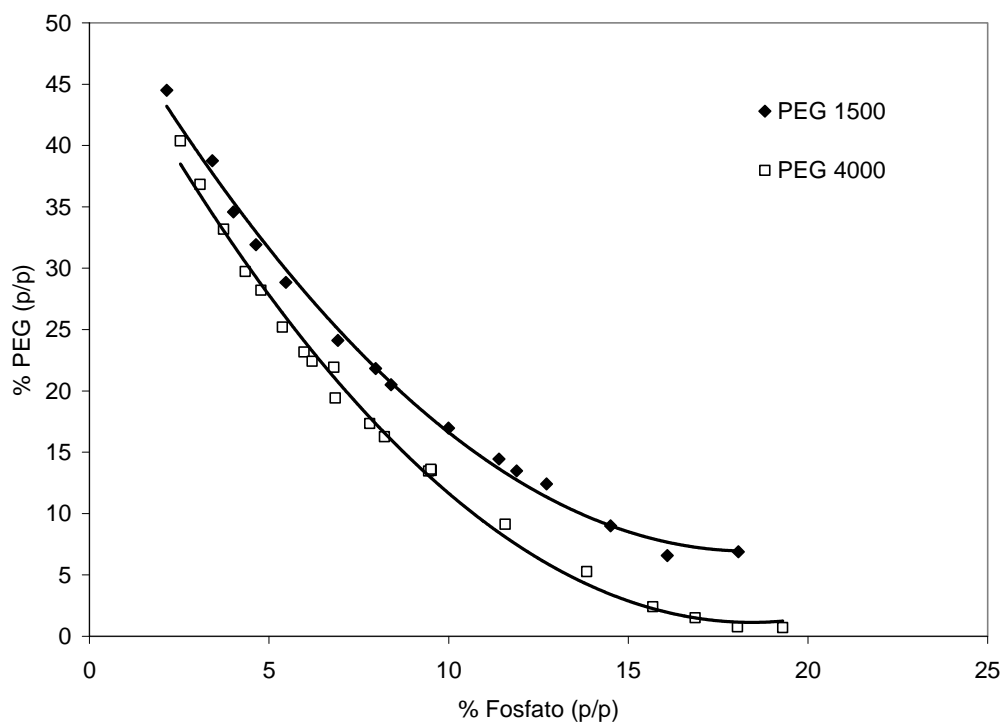


Figura 4.11 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 10,0.

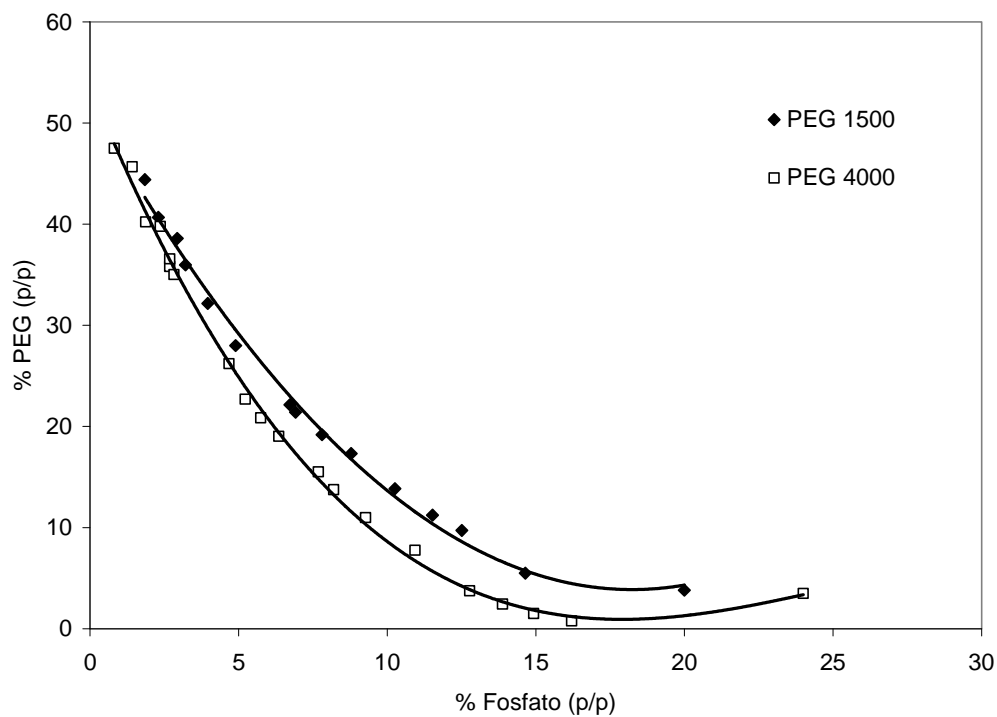


Figura 4.12 - Curvas de equilíbrio SBA PEG/Fosfato a pH 11,0.

### 4.3. Estudo do comportamento das “tie-lines”

Nas Tabelas 4.1 a 4.12 estão apresentadas as composições dos sistemas bifásicos aquosos PEG/Sal estudados ao longo deste trabalho, para diferentes pHs. Pôde-se observar que os valores das composições não se alteram muito, mesmo quando os polímeros são comparados entre si e a diferentes pHs.

Tabela 4.1 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 6,0.

<i>Tie Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	15,78	20,00	64,22	4,5	35	60,50	26	3,5	70,5
2	15,60	16,47	67,93	6,0	30	64,00	25	3,4	71,6
3	15,07	14,82	70,11	8,0	25	67,00	21	4,0	75,0

Tabela 4.2 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 7,0.

<i>Tie Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	15,52	18,76	67,72	3,5	35,6	60,9	21	3	76
2	13,65	16	70,35	21	3	76	6	27	67
3	13,37	12,7	73,93	7	22,5	70,5	18,9	3	78,1

Tabela 4.3 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  e pH 8,0.

<i>Tie Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	14,4	20,98	64,62	25,5	5,0	69,5	3,50	35,00	61,50
2	13,36	17,36	69,34	23,0	3,0	74,0	3,35	33,48	63,25
3	11,98	16,33	71,72	19,6	0,8	79,6	4,22	32,00	63,78

Tabela 4.4 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  e pH 9,0.

<i>Tie Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	14,14	21,96	63,90	2,3	42,0	55,7	24,5	2,8	72,7
2	13,36	18,78	67,86	4,1	32,5	63,4	23,0	2,0	75,0
3	12,40	15,27	72,33	19,3	1,2	79,5	5,3	28,5	66,2

Tabela 4.5 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  e pH 10,0.

<i>Tie Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	13,44	24,59	61,97	3,1	38,7	58,2	22,50	11,00	66,50
2	12,34	20,27	67,39	18,5	8,0	73,5	4,63	31,91	63,46
3	11,23	17,84	70,93	17,0	8,0	75,0	5,46	28,83	65,71

Tabela 4.6 - Composição das fases dos sistemas PEG 1500-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 11,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	16,29	18,57	65,14	6,3	24,3	30,6	25	12	63
2	14,3	15,96	69,74	22	7	71	6	25	69
3	12,96	14,22	72,82	6	24	70	18	4	78

Tabela 4.7 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 6,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	13,31	16,7	69,99	20,0	0,9	79,1	4,9	31,5	63,6
2	13,82	11,42	74,76	20,0	0,9	79,1	7,5	20,5	72,0
3	14,02	8,02	77,96	16,1	3,3	80,6	11,0	12,0	77,0

Tabela 4.8 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 7,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	13,5	16,23	70,27	4,30	30,0	65,70	21,8	2,5	75,7
2	13,4	12,40	74,20	20,41	1,0	78,59	6,4	22,0	71,6
3	13,5	8,51	77,99	18,00	0,5	81,50	8,1	15,9	76,0

Tabela 4.9 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 8,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	11,68	16,95	71,37	20,5	0,5	79	3,12	32,3	64,58
2	11,47	14,88	73,73	20,5	0,5	79	3,10	30,0	66,90
3	11,00	12,00	77,00	5,0	24,0	71	16,5	0,3	83,20

Tabela 4.10 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 9,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	13,5	19,80	66,70	23,5	9,0	67,5	4,00	30,00	66,00
2	12,2	18,50	69,30	3,0	35,2	61,8	20,80	1,40	77,80
3	11,2	16,03	72,77	4,0	30,0	66,0	18,24	0,72	81,04

Tabela 4.11 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)$  °C e pH 10,0.

<i>Tie</i> <i>Line</i>	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	14,18	19,54	66,32	24,0	5,7	70,3	3,7	33,17	63,13
2	12,84	17,89	69,36	4,0	31,5	64,5	21,0	2,00	77,00
3	11,10	15,39	73,51	5,1	28,0	66,9	16,9	1,70	81,40

Tabela 4.12 - Composição das fases dos sistemas PEG 4000-Sal a  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  e pH 11,0.

Tie Line	Composição total do sistema (%p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	14,53	18,37	67,1	4,2	30	65,8	25	7,5	67,5
2	13,03	14,03	72,94	21,5	0,5	78	4,85	26	69,15
3	12,2	12,64	75,16	18	0,3	81,7	5,5	25	69,5

Através da análise das Tabelas 4.1 a 4.12, pôde-se constatar que à medida que a “tie-line” desloca-se para cima da binodal, as composições de PEG e Sal vão se elevando, isto ocorre para todas as “tie-lines”, sem exceção.

Uma outra observação importante é que à medida que o pH do meio é aumentado, a concentração de PEG necessária para a formação do sistema também é elevada. Pôde-se notar um comportamento parabólico, na realidade, elevando-se a pHs baixos, mas reduzindo-se a pHs altos. Algumas exceções foram percebidas na análise dos resultados, principalmente em se tratando do PEG 1500. Os experimentos com o PEG 1500 foram mais demorados e dispendiosos. Isto se explica devido ao fato de não haverem na bibliografia muitos trabalhos utilizando-o como componente do sistema de duas fases aquosas.

Uma das explicações para as exceções ocorridas é que pode ter havido interferência dos sais utilizados para compor os tampões. Os sais utilizados se alteram de forma com a elevação do pH efeitos (*salting-in* ou *salting-out*). Não houve um comportamento regular da variação da composição de sal com o pH.

#### 4.4. Estudos de partição da bromelina



Existem muitos parâmetros que influenciam a partição de uma determinada proteína tais como pH, tipo e concentração de sais presentes no sistema, massa molar do polímero e concentração e propriedades da proteína, como estrutura, hidrofobicidade e massa molar (Almeida et al., 1998; Hachem et al., 1996).

Devido a complexidade dos fenômenos de partição, torna-se difícil prever o comportamento de uma determinada proteína e selecionar as condições de separação para se planejar um experimento (Hachem et al., 1996). Desta forma, a maioria dos estudos relacionados à purificação de proteínas é empírica e realizada pela variação sistemática de diversos fatores.

Neste trabalho, caracterizou-se o sistema PEG/Sal e estudou-se a influência do pH e comprimento da “tie-line” na purificação da enzima bromelina.

Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 4.13 a 4.18. É importante ressaltar que foi escolhido o PEG 4000 para esta etapa do trabalho que é a purificação da enzima, pois este apresentou melhores resultados e foi mais fácil de trabalhar do que o PEG 1500.

Tabela 4.13 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 6,0.

Tie line	K <sub>prot</sub>	K <sub>ativ</sub>	Amostra	Proteínas (µg/mL)	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,3366	0,3181	Bruta	405,5	0,020908	0,008738	1,00
			Fase Leve	124,0	0,010172	0,018230	2,08
			Fase Pesada	301,4	0,031978	0,019292	2,20
2	0,3951	1,1745	Bruta	405,5	0,018073	0,008738	1,00
			Fase Leve	152,3	0,013965	0,021323	2,44
			Fase Pesada	301,3	0,011890	0,007173	0,82
3	0,3629	0,1023	Bruta	405,5	0,018945	0,008738	1,00
			Fase Leve	143,2	0,003075	0,006134	0,70
			Fase Pesada	260,61	0,030030	0,021741	2,48

Tabela 4.14 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 7,0.

Tie line	K <sub>prot</sub>	K <sub>tativ</sub>	Amostra	Proteínas (µg/mL)	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,8456	0,4679	Bruta	341,4	0,011534	0,007343	1,00
			Fase Leve	156,6	0,002425	0,002457	0,33
			Fase Pesada	197,8	0,005183	0,004441	0,60
2	0,7501	0,9096	Bruta	341,4	0,012787	0,007343	1,00
			Fase Leve	159,8	0,010145	0,014759	2,01
			Fase Pesada	218,1	0,011153	0,012172	1,65
3	0,9077	4,2137	Bruta	341,4	0,012286	0,007343	1,00
			Fase Leve	169,6	0,011696	0,016812	2,28
			Fase Pesada	201,6	0,002776	0,003622	0,49

Tabela 4.15 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 8,0.

Tie line	K <sub>prot</sub>	K <sub>tativ</sub>	Amostra	Proteínas (µg/mL)	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,8513	4,1914	Bruta	254,0	0,014578	0,011037	1,00
			Fase Leve	217,3	0,024618	0,022205	2,01
			Fase Pesada	260,4	0,005873	0,004510	0,40
2	0,5455	0,4321	Bruta	254,0	0,014298	0,011037	1,00
			Fase Leve	192,0	0,003665	0,004060	0,36
			Fase Pesada	344,7	0,008481	0,005125	0,46
3	0,5877	0,2026	Bruta	254,0	0,014017	0,011037	1,00
			Fase Leve	217,8	0,001540	0,001767	0,16
			Fase Pesada	344,7	0,007598	0,005125	0,46

Tabela 4.16 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 9,0.

Tie line	K <sub>prot</sub>	K <sub>ativ</sub>	Amostra	Proteínas (µg/mL)	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,9988	0,1221	Bruta	408,0	0,021120	0,009412	1,00
			Fase Leve	252,9	0,006614	0,005230	0,55
			Fase Pesada	258,3	0,054125	0,042750	4,54
2	0,6420	0,8000	Bruta	408,0	0,019968	0,009412	1,00
			Fase Leve	233,3	0,008256	0,006937	0,73
			Fase Pesada	370,7	0,010315	0,005564	0,59
3	0,7735	1,6201	Bruta	408,0	0,021120	0,009412	1,00
			Fase Leve	308,3	0,014373	0,011654	1,23
			Fase Pesada	370,7	0,008871	0,005564	0,59

Tabela 4.17 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 10,0.

Tie line	K <sub>prot</sub>	K <sub>ativ</sub>	Amostra	Proteínas (µg/mL)	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,8822	0,5340	Bruta	237,3	0,008658	0,007446	1,00
			Fase Leve	215,5	0,018195	0,017587	2,36
			Fase Pesada	244,3	0,034068	0,029051	3,90
2	0,5806	0,1152	Bruta	237,3	0,007951	0,007446	1,00
			Fase Leve	227,8	0,00334	0,004072	0,54
			Fase Pesada	353,1	0,028982	0,020517	2,75
3	0,7010	2,2589	Bruta	237,3	0,008835	0,007446	1,00
			Fase Leve	170,6	0,012708	0,018167	2,43
			Fase Pesada	243,3	0,005626	0,005638	0,75

Tabela 4.18 – Resultados obtidos da partição das bromelinas do talo do abacaxi usando os SBA PEG 4000/Fosfato a pH 11,0.

Tie line	$K_{\text{prot}}$	$K_{\text{ativ}}$	Amostra	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Atividade (U)	AE (U)	FP
1	0,7719	0,4506	Bruta	258,46	0,000435	0,000344	1,00
			Fase Leve	158,53	0,004984	0,006164	17,9
			Fase Pesada	232,76	0,011061	0,01056	30,7
2	1,6262	1,5241	Bruta	258,46	0,000395	0,000344	1,00
			Fase Leve	257,15	0,009268	0,008791	25,5
			Fase Pesada	162,07	0,006081	0,009379	27,2
3	0,2173	0,6624	Bruta	258,46	0,000453	0,000344	1,00
			Fase Leve	109,53	0,007078	0,021538	62,6
			Fase Pesada	368,76	0,010685	0,007067	20,5

Perto do ponto crítico de um sistema bifásico as duas fases em equilíbrio têm composições muito semelhantes, pelo que o coeficiente de partição de biomoléculas é aproximadamente igual a 1. Pelo contrário, aumentando a concentração dos polímeros, ou seja, afastando-os do ponto crítico, aumenta-se a diferença entre as duas fases de modo que as biomoléculas distribuem-se de forma desigual entre as duas fases, podendo acumular-se preferencialmente nas fases de cima ou de baixo (Albertsson, 1986).

Analisando os sistemas polímero-sais observa-se um comportamento contrário frente aos sistemas polímero-polímero. Estudos de partição do citocromo b5 em sistemas PEG-Sais de fosfato demonstraram um aumento da partição com o aumento do comprimento da “tie-line “ (Sarmiento et al., 1994). Videira & Aires-Barros (1994) estudando a partição de ácido clavulânico e Rito-Palomares & Hernandez (1998) as proteínas do soro de queijo em sistemas PEG-Sais de fosfato também observaram o aumento do coeficiente de partição com o comprimento da “tie-line” para estes sistemas.

O efeito do comprimento da “tie-line” no volume livre em sistemas de PEG-Sais de fosfato foi investigado por Huddleston e colaboradores (1991). Abaixo do ponto crítico o volume livre da mistura PEG-Sais de fosfato é aproximadamente igual à soma dos volumes livres das soluções individuais daqueles componentes. Acima do ponto crítico, o volume livre da fase de cima, rica em Polietileno glicol, permanece relativamente constante, enquanto que o volume livre da fase de baixo, rica em fosfatos, diminui rapidamente em resposta ao aumento da concentração dos componentes do sistema.

Comparando estes resultados com os obtidos para soluções individuais de Polietileno glicol e de fosfatos pode-se concluir que o aumento do comprimento da “tie-line” promove um aumento de concentração de fosfatos na fase rica em sal, enquanto que na fase rica em Polietileno glicol esta permanece relativamente constante e igual ao seu limite de solubilidade em soluções daquele polímero. Na prática, isto resulta no “*salting-out*” das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG e consequentemente num aumento do coeficiente de partição até que os limites de solubilidade das proteínas na fase rica em sal, motivada pelo aumento da concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas para a fase rica em polímero. O coeficiente de partição de proteínas é então um parâmetro que depende das suas solubilidades relativas em cada uma das fases.

Pôde-se perceber também que na maioria dos casos a enzima ficou na fase inferior e como houve mais turbidez na fase superior, outras substâncias, como corantes naturais é que estavam tendendo para a fase superior, e assim, houve uma melhor purificação na fase inferior, com base no fator de purificação.

Analisando-se também o fator de purificação, podemos, mais uma vez, concluir que a purificação ocorreu melhor nos sistemas de pHs 9, 10 e 11, sendo que os nos pHs 6, 7 e 8 apresentaram-se valores menores. Isto se deve ao fato de que esses pHs são próximos do ponto isoelétrico da bromelina, apresentando, portanto, uma melhor purificação.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 – CONCLUSÕES

Na etapa de caracterização da enzima, pôde-se determinar todos os parâmetros cinéticos e pH e temperaturas ótimos de utilização da enzima, importantes para se efetuar um bom trabalho e de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH e temperatura agressivas às enzimas e a redução na eficiência do método empregado. Observou-se que os valores do pH ótimo da bromelina foram 4,5 e 7,0 onde apresentaram o máximo de atividade. Na determinação da temperatura ótima de utilização da enzima podemos perceber que a atividade foi baixa de 10 a 25 °C. A 30 °C houve uma elevação significativa da atividade, que permaneceu até 40 °C, apresentando sua melhor faixa de trabalho de 30 a 40 °C.

Ajustando-se os dados experimentais ao modelo linearizado da equação de Lineweaver-Burk, obteve-se o valor da constante  $K_m$  foi 0,3304 g/L e o valor de  $V_{max}$  que foi 0,03789 micromol de BSA/L.min

Analizando o comportamento dos sistemas em diferentes valores de pHs, pôde-se concluir que não houve um deslocamento significativo das binodais, ou seja, não verificou-se o deslocamento das binodais seguindo uma tendência.

Em relação à massa molar do PEG, pôde-se concluir que quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases. Analisando-se os resultados, podemos perceber claramente isto, ou seja, maiores concentrações de PEG 1500 em relação ao PEG 4000 para a formação das fases.

Em relação às “tie-lines” pôde-se observar que os valores das composições não se alteram muito, mesmo quando os polímeros são comparados entre si e a diferentes pHs. Pôde-se concluir também que à medida que a “tie-line” desloca-se

para cima da binodal, as composições de PEG e Sal vão se elevando, isto ocorre para todas as "tie-lines", sem exceção.

Uma outra conclusão importante é que à medida que o pH do meio é aumentado, a concentração de PEG necessária para a formação do sistema também é elevada. Algumas exceções foram percebidas na análise dos resultados, principalmente em se tratando do PEG 1500. Os experimentos com o PEG 1500 foram mais demorados e dispendiosos, isto explica a pouca quantidade de estudos realizados com este polímero em sistemas de duas fases aquosas.

Pôde-se concluir também que na maioria dos casos a enzima ficou na fase inferior e como houve mais turbidez na fase superior, outras substâncias, como corantes naturais é que estavam tendendo para a fase superior, e assim, houve uma melhor purificação na fase inferior.

Analisando-se o fator de purificação, podemos concluir que a purificação ocorreu melhor nos sistemas de pHs 9, 10 e 11. Isto se deve ao fato de que esses pHs são próximos do ponto isoelétrico da bromelina, apresentando, portanto, uma melhor purificação.

## **5.2 – SUGESTÕES**

Algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser feitos como a realização de mais uma etapa, que seria a liofilização da enzima purificada.

Também poderia ser desenvolvido um programa computacional que analisasse e interligasse os parâmetros obtidos em escala piloto para a escolha correta do sistema a ser usado na purificação da enzima, dependendo da amostra bruta que se tem em cada lote dos resíduos industriais do processamento do fruto.



## CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A., *Partition of cell particles and macromolecules*, John Wiley, 2º edição, 1971.

ALBERTSSON, P.A., *Partition of cell particles and macromolecules*, John Wiley, 3º edição, 1986.

ALBERTSSON, P.A., TJERNELD, F. *Phase diagrams*. Methods in enzymology, v.228, p.3-13, 1994.

ALMEIDA, M. S., KURTENBACH, E. Cutinase purification on poly (ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 151-159, 1998.

ARANTES, G., *Informações sobre produção de abacaxi na região do triângulo mineiro*. Canópolis, MG, 2001.

ASENJO, J.A., *Separation processes in biotechnology*. New York, Marcel, Dekker, 1990.

ASENJO, J.A.; *Aqueous two-phase for: i. Systems, principles and manipulation of selectivity. ii. Processes and models*. São Paulo, Apostila do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1994.

ASENJO, J.A., Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 59, p.109, 1994

BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H; SALES, A. M.; RAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. *Ocorrência da bromelina e cultivares do abacaxizeiro*. Colet. Ital, v. 23, n. 1p. 44-55, 1993.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J. *Preparation of phase system and measurement of their 87 physicochemical properties.in*: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D.

*partitionning in aqueous two phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.

BASKIR, J.N., HATTON, T. A., SUTTER, U.W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems, *Biotechnology Bioeng.*, v.34, p.541-558, 1989.

BELTER P. A., CUSSLER, E. L.; HU, W. S. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. Minneapolis, John Wiley & Sons, 1988.

BORRACINI, H. M. P. *Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

BRADFORD, M. M.; *Analytical. Biochem.*, 72, 248, 1976.

CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. in: KENNEDY, J. F., CABRAL, J. M. S. *Recovery processes for biological materials*. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 247-271.

CASCONE, O., ANDREWS, B.A.; ANSEJA, J.A., *Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems*. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.13, p. 629-635, 1991.

CÉSAR, A.C.W., SILVA, R. E LUCARINI, A.C. *Recuperação das enzimas proteolíticas presentes nas casca e talo do abacaxi*, p. 47-54, São Carlos, 1999.

CÉSAR, A.C.W., *Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2000.

CESAR, A.C.W., *Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2005.

COIMBRA, J.S.R., *Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. *Bioquímica - Aulas Práticas*, 6º edição, editora: UFPR, Curitiba, 2005.

DIAMOND, A.D., HSU, J.T., *Aqueous two-phase systems for biomolecule separation, in: advances in biochemical engineering biotechnology*, Managing Springer- Verlag Berling Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992.

DIAMOND, A .D., HSU, J.T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in biochemistry engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.

EITEMAN, M.A., Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 13-19, 1994.

FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M. R. Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 986-994, 1991.

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. *Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS*. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p.243-262, 1991.

FORGATY, W.M. & KELLY, C.T. *Topics in Enzyme and Fermentation.Biotechnology*. v.3, Chichester, G, Howood-J. Wiley & Sons, 1979.

FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 8º ed. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1989.

FRANCO, T.T. *Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. effect of surface hydrophobicity and charge*. Tese de Doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992.

GIACOMELLI, E. J.; PY, C. *Abacaxi no Brasil*. Campinas: Fundação Cargill, 1981.

GREVE, A.; KULA, M.R., Recycling of salts in partition protein extraction

processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 50, p. 27-42, 1991.

GUAN, Y. LILLEY, T. E TREFFRY, T. *A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous two-phase systems*, *Macromolecules*, 3971-3979, 1993.

GUAN, Y.; TREFFRY, T.E., LILLEY, T.H. Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 668, p-31-45, 1994.

HACHEM, F., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 507-517, 1996.

HALPERN, M.J. *Bioquímica*, 1º Edição, Editora Lidel, Lisboa, Portugal, 1997, 233-303.

HALE L.P., GREER P.K., TRINH C.T., JAMES C.L. *Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations*. *International Immunopharmacology*, 783–793, 2005.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; SCHULZE-FORSTER, K.; NUCK, R.; GRUNOW, D.; MAURER, H.R.; *J. Protein Chem.* 14, 41-52, 1995.

HARRIS, J. M., YALPANI, M. *Polymer-Ligands used in affinity partitioning and their synthesis*. in: WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. Partition in aqueous two-phase systems. Orlando: Academic, p. 589-625. 1985.

HARRIS, J.M. Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, ed Plenum, NY, 1992.

HUSTEDT, H. KRONER, K.H. E PAPAMICHAEL, N., Continuous crosscurrent aqueous two-phase extraction from biomass-automated recovery in production scale, *Process Biochemistry*, 23, 129-137, 1988.

HUDDLESTON, J.G., OTTOMAR, K.W., NGONYANI, D.M., LYDDIATT, A., Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme Microb. Technol.*, v.13, p.24-32, 1991.

HUSTEDT, H; KRONER, K. H.; KULA, M. R. *Applications of phase partitioning in the biotechnology*. in: brooks, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.

HUSTEDT, H. KREI, G.A, MEYER, U., BORNER, B. Extraction of amylase using BDBAC reversed micelles. *Bioseparation*, v.5, p.175-183, 1995.

JOHANSSON, G. PARTITIONING OF PROTEINS. IN: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.

JOHANSSON, G. *Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and, membranes*. Methods in Enzymology, v.228, p. 42-63, 1994.

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; J. BIOSCI. *Effect of pH, Temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain bromelain enzymes*, 28, 709-714, 2003.

KO, Y.H.; KANG, Y.J.; NONMUNJIP-CHEJU TAEHAKKYO, CHAYON KWAHAKPYON. *Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island*, 31, 137-142, 1990.

KRONER, K.H., HUSTEDT, H. and KULA, M- R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Proc. Biochem. Eng.*, Berlin, v. 24., 73-118, 1992.

KULA, M.R., *Purification of enzymes by liquid-liquid extration, in: advances in biochemical bioengineering*, Springer-Verlag, 1982.

KULA, M-R., *Trends and future prospects of aqueous two-phase extration*, Biosep., 1, 1990.

LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E.R., BONINO, M.J.B.J.;  
CASCON, O., Partition behaviour and purification of a mucor bacilliformis acid proteases in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v.30, p. 615-621, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. and COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª edição. São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 1995.

MATIASOON, B.LING, T.G.I., Extraction in aqueous systems for biotechnology. in: VENAL, N.S., HUDSON, M.J., *Biochemistry and Biotechnology*, p. 270-292, 1987.

MEDINA, JÚLIO CÉSAR ET AL. *abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987.

MINAMI, Y.; DOI, E.; HATA, T., *Fractionation, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain*. Agric. Biol. Chem. 35, 1419-1430, 1971.

MINAMI, N.M., *Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da Amiloglicosidase*. Dissertação de Mestrado, USP - São Paulo, 190p, 1997.

MORRIS, J. G. *Cinética de reações catalisadas por enzimas*. in: *físico-química para biólogos*. 1ª ed., São Paulo-SP: ed. Polígono, Edusp, p 323 - 367. 1972.

MURACHI, T. Bromelain Enzymes. in: Lorand, I. *Methods in enzymology*, v.xlv, New York, Academic Press, p. 475-85, 1976.

PAPAMICHAEL, N. BOERNER, B. E HUSTED, H. Continuous aqueous phase extration of proteins: automated and recycling of process chemicals, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 54, 1992.

PATHAK, S.P.; SUDSHA.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. New salt polyethylene glycol systems for two phase aqueous extration. *The Chemical Engineerring Journal*, v. 46, p. b31-b34, 1991.

PETER, H. W.; AHLERS, J. E MOREIRA, R. A. Cinética Enzimática. 1ª ed., Fortaleza – CE: EDUFC, p12-21, 1987.

PORTO, A.L.F., *Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos*. Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1998.

RABELO, A.P.B., Estudo e desenvolvimento de uma micro-coluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteína., Tese de doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H., Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry* 68, 1097-1100, 2003.

RICARDO, C. P. e TEIXEIRA, a. *Enzimas*. 4ª ed., Lisboa: Plátano editora S.A., 1993.

RIEGEL, R. E. *Bioquímica*, 3ª ed., São Leopoldo –RS, Edunisinos, 79-80p. , 2003.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v.266, n.3, p. 869-75, 1990.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J., Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 262-270, 1988.

SAID e PIETRO, R., *Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico*. Editora Eventos, 2002.

SANTANA J.C.C., *Caracterização e recuperação das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$  - amilases por sistema de adsorção em leite expandido*. Tese de doutorado, UNICAMP, 2006.

SARMENTO, M.J., PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S., Liquid-liquid extration of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v.668, p. 117-120, 1994.

SCHLUCK, A., MAURER, G., KULA, M.R., Influence of eletrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v.46, p.443-451, 1995.

SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A., Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 50, p. 617-626, 1996.

SCOPES, R.K. *Protein purification: principles and practice*. 2. ed. New York, Springer Verlag, 329 p., 1994.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C.; HAN'GUK NONGHWA HAKHOECHI. *Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple*, v. 35, 300-307, 1992.

VIDEIRA, M. ; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid estraction of clavulanic acid using na aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassim phosphate. *Journal of Chromatography A*, v.668, p.237-240, 1994.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLOUX, M.; REYNES, M., Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, v.48, p.83-90, 2001.

WALTER, H., JOHANSSON, G., BROOKS, D.E., Partitioning in aqueous twophase systems: recent results. *Analytical Biochemistry*, v.197, p.1-18, 1991.

WISEMAN, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2º edição, edited by Ellis Horwood, New York, EUA, 460 p., 1987.



YAO C.Y., TANG S.K., ZHANG J.H., YU Y.T.; Kinetics of lipase deactivation in aot/isooctane reversed micelles. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic* 18(4-6): 279-284, 2002.

YANG Z. ROBB D.A.; Tyrosinase activity in reversed micelles. *Biocatalysis and Biotransformation* 23(6): 423-430, 2005.

YANG, W.Y., LIN; C.D., CHU,I. LEE, C.J., Extration of cephalosporin c from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin c by aqueous two-phase partition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 439-445, 1994.

ZAIA, D. A. M, ZAIA, C. T. B. V, LICHTIG, J., *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, 1998.